

Cytologische Untersuchung des SD-Phänomens bei *Drosophila melanogaster*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

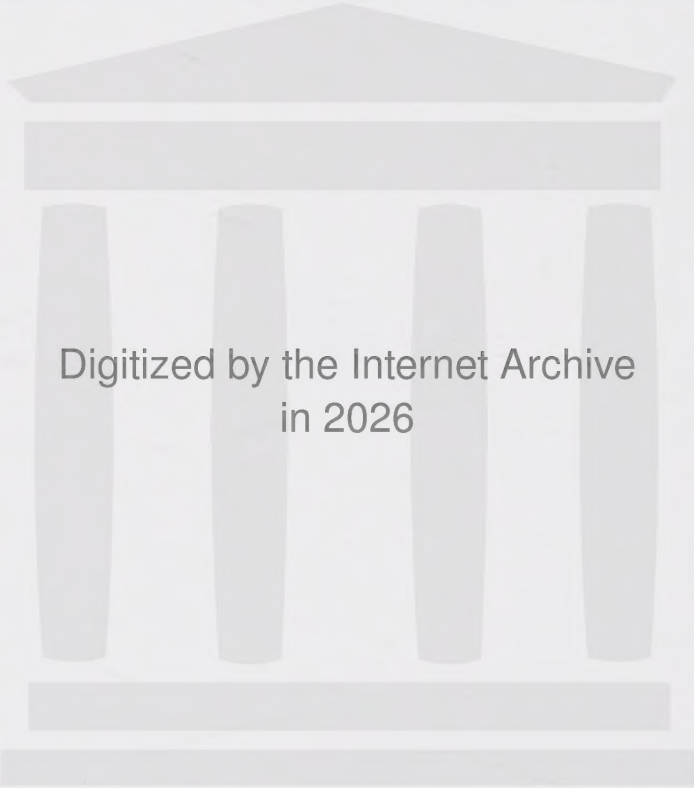
von
Renata Hanna Johansen-Stähli
von Hofstetten (Kt. Bern)

Begutachtet von
PD Dr. E. Hauschteck-Jungen
Prof. Dr. R. Nöthiger
PD Dr. U. Leemann
Prof. Dr. F. Ruch

Zürich 1987



Cytologische Untersuchung des SD-Phänomens bei *Drosophila melanogaster*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Cytologische Untersuchung des SD-Phänomens bei *Drosophila melanogaster*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

von
Renata Hanna Johansen-Stähli
von Hofstetten (Kt. Bern)

Begutachtet von
PD Dr. E. Hauschteck-Jungen
Prof. Dr. R. Nöthiger
PD Dr. U. Leemann
Prof. Dr. F. Ruch

Zürich 1987

Lebenslauf

Am 4. März 1953 wurde ich, Renata Hanna Johansen-Stähli, in Zweisimmen BE geboren. In Zweisimmen besuchte ich während vier Jahren die Primarschule und während fünf Jahren die Sekundarschule. Anschliessend besuchte ich das Gymnasium in Interlaken und die Rheingau-Oberschule in Berlin, wo ich im Dezember 1973 mit dem Abitur, Typus S6, abschloss. Im Frühjahr 1974 begann ich mein Studium an der Freien Universität Berlin, das ich im Januar 1979 mit dem Diplom als Biologin mit Hauptfach Botanik und den Nebenfächern Zoologie und Molekularbiologie abschloss.

Im Laufe meiner Studien in Berlin besuchte ich Vorlesungen, Übungen und Seminare von folgenden Dozenten: Adam, Adelsberger, Ahlers, Arndt, Belitz, Blume, Borchert, Bourwieg, Brandenburg, Bussler, Clauss, Damboldt, Döring, Drost, Engelhardt, Frydich, Geissler, Götz, Graszynski, Gregor, Haberland, Hacke, Herrmann, Hecht-Buchholz, Herz, Hoffmann, Kliesch, Köhler, Krowlow, Kümmel, Köster, Landsberg, Laskowski, Licker, Linnert, Lootz, Mai, Mathey, Melzheimer, Menzel, Müller-Doblies, Münch, Nöthel, Obe, Odenbach, Paradies, Peter, Pulvermacher, Reichert, Reinert, Reusch, Ristow, Rösch, Seipel, Schneider, Scholz, Schricker, Schwemmler, Schulze-Mold, Sperling, Steinhof, Stork, Strehlow, Thielke, Timmer, Todt, Vauk, Vogel, Wehr, Weniger, Werz, Ziegler, Zimmer, Zimmermann.

In meiner Diplomarbeit, die ich unter der Leitung von Prof. Dr. G. Linnert verfasste, untersuchte ich die Chromosomenkondensation von der Interphase bis zur Metaphase in der Mitose von *Bellevia Romana*.

In den darauffolgenden Jahren widmete ich mich ausschliesslich meinen zwei Kindern.

Im Dezember 1982 begann ich mit der Dissertation unter der Leitung von Frau PD Dr. E. Hauschteck-Jungen. Während meines Studiums in Zürich besuchte ich Vorlesungen, Übungen und Praktika bei den folgenden Dozenten: Binz, Briegel, Camenzind, Chen, Dübendorfer, Eppenberger, Hauschteck-Jungen, Honegger, Jungen, Kubli, Kummer, Labhart, Leemann, Leuthold-Glinz, Nievergelt, Nöthiger, Roos, Ruch, Schaffner, Srinivasan, Stolba, Tardent, Turner, Wehner, Went, Ziswiler.

Meinen Kindern gewidmet

Frau PD Dr. E. Hauschteck-Jungen möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des interessanten Themas, für ihre Unterstützung und ihr Interesse an dieser Arbeit herzlich danken.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. F. Ruch und Frau PD Dr. U. Leemann für die wertvollen Anregungen zur Durchführung der Messungen, die ich am Botanischen Institut der ETH Zürich mit Hilfe ihrer Apparaturen durchführen durfte.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. D.L. Hartl für die Überlassung der SD-Stämme, Herrn PD Dr. U.P. Roos und Herrn Dr. J.V. Kilmartin sowie Herrn Dr. M. Frasch für die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper danken. Frau A. Kohl danke ich für die sorgfältige Gestaltung der Zeichnungen und der graphischen Darstellungen. Mein Dank richtet sich ebenfalls an meinen Kollegen Dipl. Zool. B. Saad und an meine Mutter Hanna Stähli für die Durchsicht des Manuskripts. Meiner Familie möchte ich für das Verständnis, das sie mir und meiner Arbeit entgegenbrachten, danken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Spermatogenese	2
2.1. Meiose	3
2.2. Spermiohistogenese	3
2.2.1. Präelongation	3
2.2.2. Elongation	4
2.2.3. Transition	4
2.2.4. Postelongation	5
2.2.5. Individualisation	6
2.2.6. «Coiling»	6
3. Genetik des SD-Phänomens	7
4. Material und Methoden	9
4.1. Histochemische Darstellung der DNA	10
4.1.1. BAO-Färbung nach Ruch (1970)	10
4.1.2. DAPI-Färbung nach Russell et al. (1975)	11
4.1.3. Behandlung ungefärbter Präparate für die Absorption im Bereich von 269 nm	11
4.2. Färbung basischer Proteine	12
4.2.1. Brilliant-Sulfaflavin-Färbung (BSF) nach Leemann und Ruch (1972)	12
4.3. Antikörper gegen H1, H2A und Tubulin	13
4.4. Messmethoden	14
5. Ergebnisse	16
5.1. DNA-Gehalt pro Spermatide	16
5.1.1. BAO-gefärbte Cysten	16
5.1.2. DAPI-gefärbte Cysten	17
5.1.3. Ungefärbte Cysten	18
5.1.4. DAPI-gefärbte einzelne Kerne	19
5.2. Gehalt basischer Proteine in Spermatiden	21
5.2.1. Basische Proteine in der Kopfregion der Cyste	21
5.2.2. Basische Proteine in der Schwanzregion der Cyste	22
5.2.3. Basische Proteine im Spermatidenkern	24
5.2.4. Nachweis der beiden Histonproteine H1 und H2A mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz	26

5.3.	Längenmessung der Cysten	27
5.3.1.	Nachweis von alpha Tubulin in elongierenden Cysten	30
5.4.	Unterschiede in der Anzahl mit Brilliant-Sulfaflavin gefärbter Cysten pro Hoden vor und nach dem Desaminieren	30
5.5.	Zusammenhang zwischen dem Auftreten spermien-spezifischer Proteine und Beginn Fertilitätsperiode	33
6.	Diskussion	34
6.1.	Relativer DNA-Gehalt der Spermatiden von SD-Stämmen und Kontroll-Stämmen nach BAO- bzw. DAPI-Färbung	34
6.2.	Relativer Gehalt basischer Proteine der Spermatiden von SD-Stämmen und Kontroll-Stämmen nach Brilliant-Sulfaflavin-Färbung	36
6.3.	Funktion spermien-spezifischer Proteine	39
7.	Zusammenfassung	41
8.	Literaturverzeichnis	43

1. Einleitung

Männchen von *Drosophila melanogaster*, die heterozygot für die sog. SD-Faktoren sind (SD steht für Segregation Distorter), also SD/+ Männchen, produzieren 95% oder mehr Nachkommen, die das «SD-Chromosom» enthalten, d.h. mehr als die erwarteten 50% (Hartl, Hiraizumi und Crow, 1967; Nicoletti, Trippa und DeMarco, 1967). Solche SD-Chromosomen werden in den meisten Wildpopulationen von *Drosophila melanogaster* gefunden (Sandler, Hiraizumi und Sandler, 1959; Hartl, 1975; Hartl und Hiraizumi, 1976; Crow, 1979). Bei diesen heterozygoten SD-Männchen sind die Hälfte der Spermien nicht funktionstüchtig. Cytologische und histochemische Befunde weisen darauf hin, dass der Ausfall der +-Spermien von defekter Chromatinkondensation (Tokuyasu, Peacock und Hardy, 1977; Kettaneh und Hartl, 1980) im Zusammenhang mit gestörter Histontransition (Kettaneh und Hartl, 1976; Hauschteck-Jungen und Hartl, 1982) während der Spermiogenese verursacht werden könnte. Verschiedene Modelle wurden entwickelt, um das SD-Phänomen zu erklären (Hartl, 1973, 1974, 1975, 1980; Ganetzky, 1977; Hiraizumi und Martin, 1979; Hiraizumi, Martin und Eckstrand, 1980; Hiraizumi und Thomas, 1984; Brittnacher und Ganetzky, 1983; Lyttle, 1979, 1984; Matthews und Mortin, 1983; Nicoletti, 1968; Nicoletti und Trippa, 1967; Sandler und Hiraizumi, 1960). Der genaue Mechanismus, der zur Fehldifferenzierung der Hälfte der Spermatiden führt, ist immer noch unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wird die Spermiogenese bei SD-Stämmen verschiedener Herkunft cytochemisch-morphologisch analysiert, um Kriterien zu finden, die allen SD-Stämmen gemeinsam sind, und in denen sie sich andererseits von Kontrollstämmen unterscheiden. Dies ist einer der möglichen Wege, um Aufklärung über die Wirkungsweise der SD-Faktoren zu erhalten.

Es wird gezeigt, dass nur mit einem der untersuchten Kriterien, nämlich mit dem Gehalt basischer Proteine im Spermienkern, eine klare Trennung zwischen den SD-Stämmen und dem Wildstamm möglich ist.

2. Spermatogenese

Zum Verständnis der vorliegenden Arbeit ist es notwendig, den Verlauf der Spermatogenese bei *Drosophila melanogaster* zu charakterisieren: sie wurde am ausführlichsten von Tokuyasu und Mitarbeitern (Tokuyasu, Peacock und Hardy, 1972a, 1972b, 1977; Tokuyasu 1974a, 1974b, 1975a, 1975b; Lindsley und Tokuyasu, 1980) von Tate (1971) und von Stanley, Bowman, Romrell, Reed und Wilkinson (1972) analysiert. Tokuyasu und Mitarbeiter unterteilen die Spermiogenese in: (1) Präelongation, (2) Elongation, (3) Transition, (4) Postelongation, (5) Individualisation und (6) «Coiling». Im Folgenden richtet sich meine Einteilung der Spermiogenese nach derjenigen von Tokuyasu, Peacock und Hardy.

Die Hoden von *Drosophila melanogaster* bestehen aus einem Paar gedrehter Schläuche, 2 mm lang und 0.1 mm im Durchmesser (Abb. 1). In der apikalen Hodenzone (Abb. 2) sind diploide Spermatogonien, die durch mitotische Teilung von Stammzellen entstanden sind, lokalisiert. In dieser Zone des Hodens entstehen sogenannte Cysten, indem ein primäres Spermatogonium von zwei Cystenzellen, die somatischen Ursprungs sind, umgeben wird. Innerhalb der Cyste, die sich noch am apikalen Ende des Hodens befindet, teilen sich die Spermatogonien viermal mitotisch mit unvollständiger Cytokinese. Ohne weitere Teilung erfolgt der Uebergang von Spermatogonien zu Spermatocyten I. In dieser Phase vergrößert sich das Zellvolumen um das 25fache. Anschliessend finden die beiden meiotischen Teilungen, ebenfalls mit unvollständiger Cytokinese, statt; sie führen zu 64 Spermatisiden pro Cyste.

Drosophila-melanogaster-Männchen produzieren während ihres ganzen Lebens Spermien. Der Hoden enthält Keimzellen aller Entwicklungsstadien, je nach Alter des Männchens in unterschiedlicher Häufigkeit. Um die Kinetik der Gametenproduktion zu beschreiben, prägten Tokuyasu und Mitarbeiter den Begriff des «steady state» des Hodens. Nach ihrer Meinung balanciert der Output von Cysten mit 64 Spermien genau den Input von primären Spermatogonien, einzelnen Spermatogonien, die von Cystenzellen eingeschlossen werden. Der «steady state» des Hodens ist abhängig von folgenden Parametern: (1) der Anzahl der Stammzellen, (2) der Länge des Stammzellzyklus und (3) der Zeit, die für die Entwicklung eines primären Spermatogoniums zu Spermatozoen benötigt wird. Wird einer dieser Parameter gestört, dann ändert sich der «steady state». Somit lässt sich die verminderte Spermienproduktion bei alternden Männchen mit der Veränderung mindestens eines Parameters erklären.

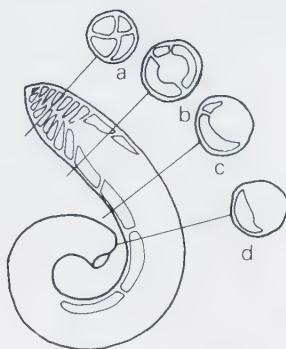
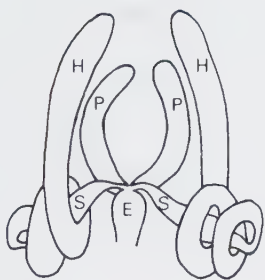


Abb. 1. Schema der männlichen inneren Geschlechtsorgane von *Drosophila melanogaster*. (H) Hoden, (S) Samenblase, (P) Paragoniendrüse und (E) Ejakulationsgang. (Nach Kettaneh und Hartl, 1980).

Abb. 2. Längs- und Querschnitt der ersten halben Windung des Hodens. Die scheibenförmigen Cysten mit Spermatocyten I liegen senkrecht in annähernd strahlenförmiger Anordnung zur Achse des Hodens (a). Mit zunehmender Reifung der Spermatocyten I treffen diese auf bereits elongierte Spermatiden (nicht im Bild), und neigen sich dann gegen die Hodenwand, an der sie bis zur Basis des Hodens entlanggleiten (b-d). Die Meiose findet auf der konkaven Seite der ersten Windung des Hodens statt. (Nach Lindsley und Tokuyasu, 1980).

2.1. Meiose

Cysten, die Spermatocyten I enthalten, bilden scheibenförmige Schichten. Diese Scheiben liegen senkrecht in strahlenförmiger Anordnung zur Längsachse des Hodens (Abb. 2). Die Cysten gleiten während ihrer Entwicklung kontinuierlich zur Basis des Hodens hinab, da sie von neu entstandenen Cysten basal verschoben werden. Sobald sie den Bereich von bereits elongierten Cysten erreichen, neigen sie sich so, dass sie in einer gegen die Hodenwand flachen Schicht, die zwischen Hodenwand und den elongierten Cysten in der ersten Windung des Hodens ausgebildet wird (Abb. 2), zu liegen kommen. Anschließend an diese Wachstumsphase folgen die beiden meiotischen Teilungen. Innerhalb der immer noch scheibenförmigen Cyste befinden sich jetzt 64 Spermatiden.

2.2. Spermiohistogenese

2.2.1. Präelongation

Zu Beginn dieses Stadiums liegen die gerade noch scheibenförmigen Cysten flach an der inneren konkaven Oberfläche der Hodenwand (Abb. 2d). In jedem Spermatid bilden die Mitochondrien den sogenannten Nebenkern (Tates, 1971),



der anschliessend inäqual in die zwei Mitochondrienderivate geteilt wird. Im Zellkern, der von einer Schicht endoplasmatischen Reticulums (ER) umgeben wird, entwickelt sich eine nucleolusähnliche Struktur, die aber nach Beginn der Elongation der Spermatiden verschwindet (Tates, 1971; Tokuyasu, 1974b). Das Cytoplasma ist voll von Ribosomen und den vielfachen Schichten des ER. An den Stellen, wo diese Schichten aufeinander treffen, treten sie mit einzelnen Bündeln von Mikrotubuli in Verbindung. Diese Agglomerationen können bis in die Postelongation bestehen bleiben. Sehr wahrscheinlich wird so die parallele Anordnung von diesen Verbindungen zum Axonema ermöglicht. Nicht mit den ER Schichten assoziierte Mikrotubuli beginnen sich parallel zum Axonema auszurichten.

2.2.2. Elongation

In diesem Stadium strecken sich alle Spermatiden einer Cyste, deren Gestalt dadurch länglich wird. Dabei richten sich die Köpfe, die im Gegensatz zum übrigen Zellkörper durch Zellwände getrennt sind (Tokuyasu, Peacock und Hardy, 1972a), zur Basis des Hodens.

Einem Drittel der äusseren Kernmembran (Abb. 3a) liegt elektronendichtes cytoplasmatisches Material auf (Abb. 3). Sobald Mikrotubuli in diesem Bereich erscheinen, senkt sich der sogenannte «dense complex», bestehend aus dem dichten Cytoplasma und den Mikrotubuli, über die ganze Länge des Kernes konkav ein (Abb. 3). In dieser Phase der Spermatogenese ist das Chromatin, ausser in der Kernperipherie, noch weitgehend dekondensiert. Der Kern erreicht am Ende der Elongation seine volle Länge (Tokuyasu, 1974c).

In der Schwanzregion des Spermatids wächst das Axonema bei abnehmender Anzahl der Schichten ER, die das Axonema und die beiden Mitochondrienderivate umgeben, in die Länge. Die kaudale Spitze der Spermatide, die reich an Ribosomen und endoplasmatischem Reticulum ist, verändert sich nicht. Einer Hypothese zufolge ist sie der Hauptsyntheseort für das Material, das während der Elongation benötigt wird (Lindsley und Tokuyasu, 1980).

Zu Beginn der Elongation liegen die meisten Mikrotubuli, die in einer gallertigen ribosomenlosen Grundsubstanz gefunden werden, parallel zum Axonema. Ihre Anzahl verdoppelt sich während der Elongation.

2.2.3. Transition

In dieser Periode finden zwei bemerkenswerte Prozesse statt. Der eine betrifft die vollständige Neuverteilung der Mikrotubuli um den Kern. Hierzu wandern die Mikrotubuli aus der konkaven Einbuchtung (Abb. 3d) mit und gegen den Uhrzeigersinn auf die gegenüberliegende Seite der Kernhülle. Gleichzeitig wird die Schicht ER, die den Kern während der Elongationsperiode vollständig umgeben hatte, in Stücke variabler Länge zerlegt. Der andere Prozess betrifft die gegenseitige Anordnung des Kernes und des Axonemas (Tokuyasu, 1974c), bei dem der Kern in die Verlängerung des Axonemas zu liegen kommt.

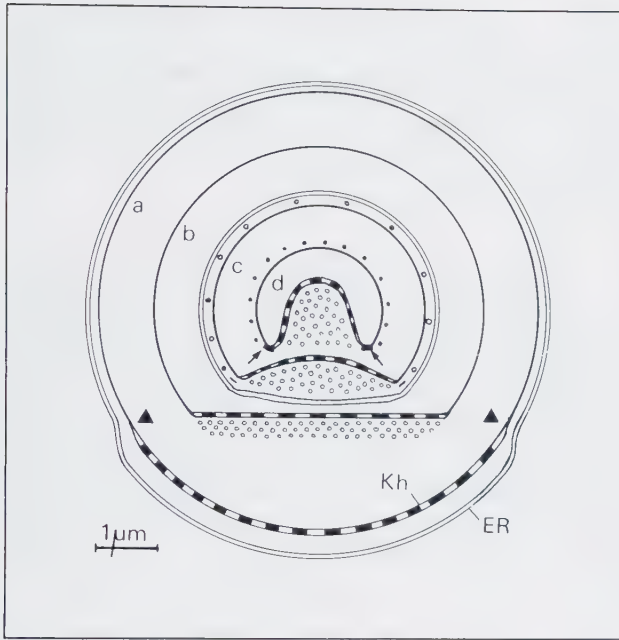


Abb. 3. Querschnitt eines Kerns in verschiedenen Stadien der Elongation. Die aufeinander folgenden Stadien (a–d) sind ineinander gezeichnet. Ein Drittel der Kernhülle (Kh) ist in zwei Bereiche unterschiedlicher Elektronendichte eingeteilt (zwischen den Pfeilen in a). Zwischen diesem Teil der Kernhülle (Kh) und dem endoplasmatischen Reticulum (ER) wird elektronendichtes Material angesammelt (a). Sobald Mikrotubuli in diesem Bereich erscheinen, wird die angrenzende Kernhülle (Kh) zuerst abgeflacht (b), und dann wird sie konkav (c und d). Auf der gegenüberliegenden Seite der Kernhülle (Kh) erscheinen vereinzelte Mikrotubuli (c und d). Später in dieser Periode sind Streifen aus elektronendichtem Material (Pfeile in d) mit dem Kern verbunden. (Nach Lindsley und Tokuyasu, 1980).

2.2.4. Postelongation

Nachdem die Wanderung der Mikrotubuli vollendet ist, beginnt das Chromatin sich an der Innenfläche der Kernhülle zu kondensieren, zwischen diesem peripheren Chromatin und den im Innenraum des Kernes erscheinenden Chromatinaggregaten wird ein Netzwerk ausgebildet (Tokuyasu, 1974c). Während der zunehmenden Aggregation des Chromatins wird die Einbuchtung der Kernhülle (Abb. 3d) wieder abgeflacht. Ausserdem wird in dieser Phase der Spermiogenese eine histochemisch beobachtbare Veränderung im basischen Kernprotein von einem vorwiegend lysinreichen Typ zu einem argininreichen spermienspezifischen Typ sichtbar (Das, Kaufmann und Gay, 1964). Diese Veränderung im basischen Kernprotein wurde von den Autoren als Histontransition bezeichnet.

2.2.5. *Individualisation*

In dieser Periode wird jedes Spermatid einer Cyste mit einer eigenen Membran eng umgeben. Dieser Prozess beginnt in der Kopfregion der Cyste mit der Einstülpung der Zellmembran. Mit fortschreitender Individualisation nimmt das Volumen des sogenannten «cystic bulges» zu, einer Erweiterung der Cyste, die cytoplasmatisches Material kaudal entfernt.

2.2.6. «Coiling»

Sobald die Individualisation der Cyste vollendet ist, senkt sich die Cystenzelle, die die Kopfregion des Spermienbündels umgibt, in das terminale Epithel des Hodens ein. Dann wird das Spermienbündel, von der Kopfregion ausgehend, in die Basis des Hodens gezogen, indem es spiralförmig aufgenommen wird. Gleichzeitig steigt die Anzahl der Mikrotubuli (Durchmesser 150 Angstroem) im Lumen der Cyste an. Dann werden die reifen Spermien aus den Cystenzellen entlassen und gelangen in aufgewundenem Zustand in die Samenblase. Die Cystenzellen werden von den Zellen des terminalen Epithels eingeschlossen und resorbiert.

3. Genetik des SD-Phänomens

Die gestörte Segregation wird durch Loci bedingt, die auf dem zweiten Chromosom liegen. Männchen, die heterozygot für SD sind, geben an 95% ihrer Nachkommen das SD-Chromosom weiter. Die gestörte Segregation ist hauptsächlich von zwei genetisch trennbaren Elementen abhängig, einem Element Sd (Sd = Segregation distortion) auf dem SD-Chromosom und einem Element, das Responder sensitiv (= Rsp sens) genannt wurde, auf dem Wild-Chromosom (Sandler und Hiraizumi, 1960; Hartl, 1974).

Das Element Sd wurde durch Deletionen im polytären SD-Chromosom cyto-genetisch in der Region 37D2-6, also im linken Arm des zweiten Chromosoms (Ganetzky, 1977; Brittnacher und Ganetzky, 1983), lokalisiert. Da beide zweiten Chromosomen im Verhältnis 1:1 in der Nachkommenschaft erscheinen, wenn der Sd-Locus deletiert wurde, deutet dies darauf hin, dass die abnormale Spermatogenese durch das Vorhandensein von Sd und nicht durch das Fehlen irgendeiner Wildtyp-Funktion zu Stande kommt.

Hartl (1973) zeigte, dass es verschieden lange Cistronen im Sd-Locus gibt, z.B. beim SD(NH)-2 eine längere Komplementationseinheit als beim SD-5 und beim SD-72^{bw}, die untereinander ähnlich sind.

Der Rsp-Locus wurde nahe des Centromers im Heterochromatin des rechten Armes des zweiten Chromosoms lokalisiert (Hiraizumi, Martin und Eckstrand, 1980). Eine Deletion im Rsp-Locus eliminiert die Sensitivität des Wild-Chromosoms (Ganetzky, 1977). Dies zeigt, dass Rsp wie Sd keine Rolle in der normalen Spermatogenese spielt, und dass die Insensitivität für die Wirkung von Sd das Fehlen von Rsp bedeuten könnte.

Mehrere Autoren wiesen nach, dass für den Rsp-Locus mehrere Varianten existieren (Hiraizumi und Martin, 1979; Hiraizumi und Thomas, 1984; Temin und Marthas, 1984), jede mit charakteristischer Sensitivität. Sd kann daher, sogar wenn beide Homologe sensitiv sind, gestörte Segregation bewirken; in diesem Fall überlebt das weniger sensitive Chromosom bevorzugt.

Der Ausprägungsgrad des SD-Phänomens ist jedoch nicht nur abhängig von Sd und Rsp, sondern er wird von Modifikatoren, die von Stamm zu Stamm verschieden sind (Trippa und Loverre, 1975), beeinflusst. Diese Modifikatoren wurden als Suppressoren und Enhancer charakterisiert.

Die genetischen Interaktionen, die zu der gestörten Segregation führen, sind unklar. Es wurden aber mehrere Hypothesen vorgeschlagen (Hartl, 1973; Ganetzky, 1977; Brittnacher und Ganetzky, 1983; Martin, Hiraizumi und Eckstrand, 1980). Alle teilen die Vermutung, dass Loci auf dem Wild-Chromosom, die normalerweise inaktiv sind, durch die Wirkung der Loci des SD-Chromosoms aktiv

werden. Nach dem Modell von Hartl (1973) interagieren die Sd- und Rsp-Elemente folgendermassen: für die Spermienreifung ist es notwendig, dass der Rsp-Locus mit dem Produkt des Sd-Locus einen Komplex bildet. Das Sd-Produkt wäre ein multimeres Regulatorprotein. Es können drei Arten multimerer Regulatorproteine unterschieden werden: Sd+/Sd+ sollte sowohl mit dem Rsp sensitiv als auch mit dem Rsp insensitiv reagieren können, Sd+/Sd bevorzugt mit dem Rsp insensitiv und Sd/Sd weder mit dem Rsp sensitiv noch mit dem Rsp insensitiv. Die nachgewiesene gestörte Histontransition (Kettaneh und Hartl, 1976; Hauschteck-Jungen und Hartl, 1982) und die damit vermutlich in Zusammenhang stehende gestörte Chromatinkondensation (Tokuyasu, Peacock und Hardy, 1972a, 1977; Kettaneh und Hartl, 1980) gaben Anlass zu der Hypothese, dass die Loci, die das SD-Phänomen verursachen, irgendwie die Histontransition während der Spermatogenese regulieren könnten (Hauschteck-Jungen und Hartl, 1982).

4. Material und Methoden

Die untersuchten Männchen von *Drosophila melanogaster*, die auf dem zweiten Chromosom die SD-Loci trugen (SD-Männchen), stammten aus verschiedenen geographischen Regionen: die Linien SD(NH)-2 und R-1^{bw} aus Japan, die Linien SD-72^{bw} und SD-5 aus den USA und SD(ROMA)^{bw} aus Italien. Die Herkunft der Linie S-90 ist nicht bekannt. Als Kontrolle dienten Männchen des Wildstammes Eierbrechtstrasse, der seit 1976 in Zucht ist, und Männchen eines für die beiden Loci cinnabar (cn) und brown (bw) homozygoten Stammes.

Alle Tiere wurden auf Normalfutter, bestehend aus gemahlenen Maiskörnern, Nipagin, Rohrzucker, Rohagar und Trockenhefe bei einer Temperatur von 25.5 Grad Celsius gezüchtet. Zum Zeitpunkt der Sektion waren die Männchen bis zu drei Tage alt.

Den Männchen wurde ein Schenkel des paarigen Hodens (Abb. 1) entnommen. Auf einem Objektträger in einem Tropfen Ringerlösung wurden die Hodenwände mit der Pincette entfernt, die Cystenbündel auseinandergezupft und die einzelnen Cysten auf dem Objektträger verteilt. Das Anhaften des Gewebes auf den Objektträger erfolgte durch das Eintrocknen der Ringerlösung an der Luft (Hauschteck-Jungen und Maurer, 1976). Die so hergestellten Präparate wurden verschiedenen Färbeverfahren unterzogen. Die einzelnen Schritte sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

4.1. Histochemische Darstellung der DNA

4.1.1. BAO-Färbung nach Ruch (1970)

Vorgang	Lösung	Dauer
Präparation	Gepufferte Insektenringerlösung pH 7	7–45 min
Fixieren	Alkohol (96 %): Eisessig = 3:1	
Waschen	70 % Alkohol	
Hydrolysieren	6 n HCl	8 min
Waschen	Aqua dest.	12 min
Färben	BAO-Lösung (1)	1–3 h
Waschen	Bisulfitwasser (2)	3 × 10 min
Waschen	Leitungswasser	5 min
Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol.		
Einbetten	Fluoromount (Gurr)	

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Fixierlösung wurde auf das Gewebe aufgetropft. Nach dem Eintrocknen wurde das Gewebe erneut mit Fixierlösung bedeckt. Dieses Vorgehen wurde ein drittes Mal wiederholt. Der Fluoreszenzfarbstoff BAO (Abb. 4) wurde von der Firma Fluka AG (9470 Buchs, Schweiz) bezogen.

(1) Die BAO-Lösung wurde nach Ruch (1970) hergestellt: 0.001 g BAO gelöst in 1 ml 1 n HCl, verdünnt mit 10 ml Aqua dest. und 0.5 ml NaHSO₃ 10%ig.

(2) Bisulfitwasser: 180 ml Aqua dest.; 10 ml 1 n HCl; 10 ml NaHSO₃ 10%ig.

Abb. 4. Chemische Struktur von (a) DAPI (Serva), (b) BAO (aus Leemann und Ruch, 1970) und (c) Brilliant-Sulfaflavin (aus Leemann und Ruch, 1972).

4.1.2. DAPI-Färbung nach Russell et al. (1975)

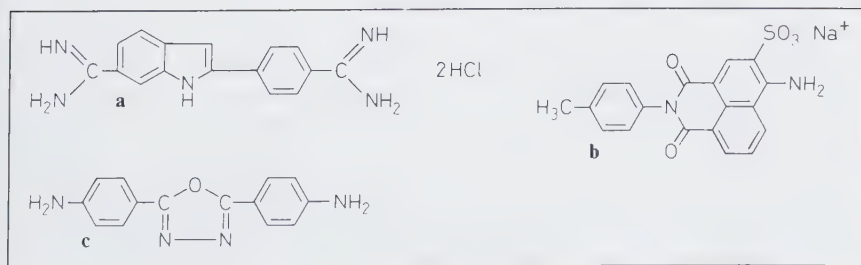
Vorgang	Lösung	Dauer
Präparation	Gepufferte Insektenringerlösung pH 7	7-45 min
Fixieren	Alkohol (96 %):Eisessig = 3:1	
Waschen	70 % Alkohol	
Waschen	McIlvaine-Puffer pH 7 (1)	10 min
Färben	0.002 % DAPI in McIlvaine-Puffer pH 7	20 min
Waschen	McIlvaine-Puffer pH 7	1 min
Einbetten	McIlvaine-Puffer:Glycerin = 1:1	

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Abb. 4) wurde von der Firma Serva (Chemie Brunschwig AG in 4009 Basel, Schweiz) bezogen.

(1) McIlvaine-Puffer pH 7: 0.378 g Zitronensäure + 2.92 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Aqua dest.

4.1.3. Behandlung ungefärbter Präparate für die Absorption im Bereich von 269 nm

Es wurden Objektträger und Deckgläser, die aus Quarzglas bestanden (Zeiss), verwendet. Für die Absorptionsmessung im UV-Bereich (269 nm) wurde das Gewebe entweder in Alkohol (96 %): Eisessig = 3:1 fixiert und in PBS-Puffer (siehe unter 4.2.1.) / Glycerin eingedeckt, oder nach gleicher Fixation zusätzlich in pankreatischer Ribonuclease (5 mg RNase / 1 ml Aqua dest.) für zwei Stunden bei 36 Grad Celsius inkubiert.



4.2. Färbung basischer Proteine

4.2.1. Brilliant-Sulfaflavin-Färbung (BSF) nach Leemann und Ruch (1972)

Vorgang	Lösung	Dauer
Präparation	Ungepufferte Insektenringerlösung	7–45 min
Fixieren	3.5 % Formaldehyd (1) in PBS-Puffer pH 7.3 (2)	17–20 h bei 6 Grad C
Waschen	Aqua dest.	30 min
Hydrolysieren	5 % TCA	170 min bei 60 Grad C
Waschen	70 % Alkohol	3 × 5 min
Waschen	Clark und Lubs-Puffer pH 8.2 (3)	5 min
Färben	0.1 % Brilliant-Sulfaflavin in Clark und Lubs-Puffer pH 8.2	30 min
Waschen	Clark und Lubs-Puffer pH 8.2	3 × 5 min
Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol.		
Einbetten	Fluoromount (Gurr)	

(1) Formaldehyd: 3.5 g Paraformaldehyd gelöst in 100 ml PBS-Puffer bei 60 Grad Celsius, filtriert durch Milliporefilter (Durchmesser 0.45 μ). Für jede Präparateserie wurde frisches Formaldehyd hergestellt.

(2) PBS-Puffer pH 7.3: 8 g NaCl + 0.2 g KCl + 0.2 g KH_2PO_4 + 1.15 g Na_2HPO_4 in 1 l Aqua dest.

(3) Clark und Lubs-Puffer pH 8.2: 0.31 g Borsäure + 0.373 g KCl + 5.9 ml 0.1 n NaOH auf 1 l Aqua dest. Für den Gebrauch wurde der Puffer 10 × verdünnt.

Der Fluoreszenzfarbstoff Brilliant-Sulfaflavin (Abb. 4) wurde von der Chroma (Stuttgart Untertürkheim, Deutschland) bezogen (nicht näher charakterisiert und nicht mehr käuflich). Unter der gleichen Bezeichnung wurde von der Chroma auch ein Fluoreszenzfarbstoff geliefert, der nicht fluoreszierte und der deshalb nicht zur Färbung der zu messenden Cysten verwendet wurde.

Um argininreiche spermienspezifische Kernproteine von lysinreichen Kernproteinen unterscheiden zu können, wurden die Lysinreste durch Desaminieren blockiert (Bloch, 1966). Die Präparate wurden nach der Hydrolyse in TCA und dem Waschen in 70 % Alkohol mit einer Lösung aus 5 % Natriumnitrit und 5 % Essigsäure (3 × 15 min) behandelt. Nach dem Desaminieren wurden die Präparate in Aqua dest. gewaschen (10 min) und wie oben gefärbt.

4.3. Antikörper gegen H1, H2A und Tubulin

Vorgang	Lösung	Dauer
Präparation	Ungepufferte Ringerlösung	7–45 min
Fixieren	3.5% Formaldehyd in PBS-Puffer pH 7.3 (siehe unter 4.2.1)	15 min
Waschen	PBS-Puffer pH 7.3	2 × 10 min
Vorinkubation	5% Serum* in PBS-Puffer pH 7.3	30 min
Inkubation 1	Erster Antikörper in PBS-Puffer pH 7.3, unverdünnt (H1, H2A und Tubulin, siehe Legende)	30 min
Waschen	PBS-Puffer pH 7.3	2 × 10 min
Inkubation 2	Zweiter Antikörper in PBS-Puffer pH 7.3, 40 × verdünnt, FITC-markiert (siehe Legende)	30 min
Waschen	0.002% DAPI in PBS-Puffer pH 7.3	10 min
Waschen	PBS-Puffer pH 7.3	10 min
Einbetten	PBS-Puffer:Glycerin (wasserfrei) = 1:1	

Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Die zweite Inkubation und die folgenden Schritte wurden im Dunkeln ausgeführt. Die monoklonalen Antikörper gegen H1 und H2A von *Drosophila melanogaster* stammten vom Max-Planck-Institut für Virusforschung (Abteilung für Physikalische Biologie, Speemannstrasse 35, 7400 Tübingen, Deutschland). Die zweiten Antikörper waren FITC-markiert (Fluorescein) und wurden von der Firma Miles Yeda bezogen. Erzeugt wurden sie im Kaninchen, das gegen Maus immunisiert worden war: rabbit-anti-mouse IgG.

Der Antikörper gegen Tubulin war auch monoklonalen Ursprungs. Es handelte sich um YL 1/2 von Kilmartin, Wright und Milstein (1982), einen Ratten-Antikörper gegen Tubulin, das aus der Hefe *Saccharomyces uvarum* isoliert worden war. Dieser Antikörper bindet spezifisch an die alpha-Untereinheit des Tubulins. Für diese Präparate wurden FITC-konjugierte goat-anti-rat IgGs von der Nordic (Biogenzia Lemania, Lausanne, Schweiz) verwendet.

* Die Präparate wurden mit Kaninchenserum (H1 und H2A) und Ziegen serum (Tubulin) der Firma Nordic vorbehandelt. Dadurch sollte die Spezifität der Bindung von den Antikörpern erhöht werden.

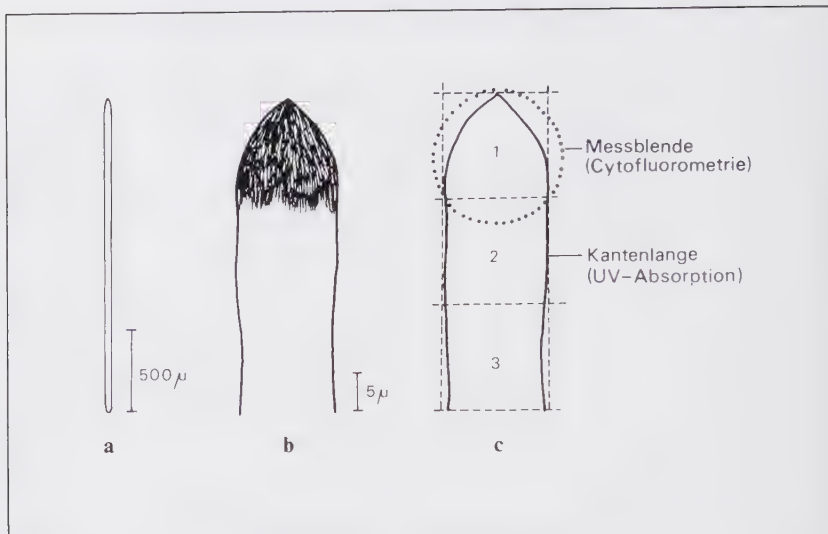


Abb. 5. Optischer Längsschnitt einer Cyste, die Kopfregion enthaltend. (a) Cyste in voller Länge, (b) und (c) Kopfregion der Cyste, dunkel = Region der Spermatidenkerne (b). Bei der Cytofluorometrie wurde die Fluoreszenzintensität pro Messblende des Durchmessers von $22\ \mu$ gemessen. Bei der Absorption im UV-Bereich (269 nm) wurde die Extinktion pro vom Scanning-Tisch vorgegebene Messfläche gemessen (Scanning in $0.5\ \mu$ -Schritten, Messblendendurchmesser $1\ \mu$), und integriert. Die Messflächen hatten die Kantenlänge $15.5\ \mu$, die Breite der Messfläche wurde an die Breite der Cyste angepasst. Das Verschieben der Messfläche erfolgte manuell. In der Abbildung sind die Messflächen als Quadrate dargestellt. Die Messblenden der Cytofluorometrie und der Absorptionsphotometrie sind nicht identisch. Die Messungen wurden mit zwei verschiedenen Apparaturen durchgeführt.

Es ist möglich, dass der zweite Antikörper unspezifisch bindet, d.h. nicht an den ersten Antikörper. Um dies zu prüfen, wurde ein Teil der Präparate direkt mit dem zweiten Antikörper inkubiert.

4.4. Messmethoden

Um die Histontransition quantitativ zu untersuchen, wurden Kopfregionen von elongierenden Cysten (64n, Abb. 5) sowie bereits elongierte, separat liegende Spermatidenkerne nach Beginn der Individualisation, für die Messung selektionierte.

Die Cytofluorometrie erfolgte an einem Zeiss Zytofluorometer. Alle Messungen wurden mit einem Zeiss Neofluar Objektiv 40/0.75 gemacht. Die Messungen wurden mit violetter Erregerlicht durchgeführt (Filterkombination, Zeiss:

BP375-425, LP390, FT425 und LP450). Unter der Voraussetzung, dass die gemessene Fluoreszenzintensität dem Gehalt der fluorochromierten Substanz proportional ist (Ruch, 1970), lassen sich die Werte der Fluoreszenzintensitäten als relative Substanzwerte verwenden.

Die Mikrospektrophotometrie (Absorptionsphotometrie) im ultravioletten Spektralbereich erfolgte am Zeiss-Mikroskop-Photometer 01. Das verwendete Gerät arbeitete nach der Einstrahlmethode, d.h., der zur Messung verwendete Lichtstrahl diente zugleich der Bestimmung des Leerwertes, also zur Messung einer absorptionsfreien Stelle des Präparates. Alle Messungen wurden mit einem Zeiss Ultrafluor Glycerinimmersionsobjektiv mit 100facher Vergrößerung durchgeführt. Zur Bestimmung der Extinktion gilt folgende Beziehung:

$$E = \log I_0/I = k \cdot c \cdot d \text{ (Lambert-Beersches Gesetz)}$$

I_0 = Leerwert

I = Messwert im Präparat

k = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Schichtdicke

Die Messungen im UV-Bereich erfolgten nach dem Absuchverfahren («Scanning»). Der Strahl wurde hierbei mäanderartig über das Präparat, in einem definierten Bereich (Abb. 5) geführt, so dass nach und nach jede interessierende Objektstelle zur Messung gelangte. Die Gesamtmenge des absorbierenden Materials in diesem Bereich ist gleich dem Integral der Extinktionen der einzelnen Flächenelemente:

$$M = \int E \cdot F \cdot dF$$

F = Fläche

E = Extinktion

$\int F \cdot dF$ = gesamte Fläche

Die Summierung wurde beim Absuchen automatisch durchgeführt, und das Extinktionsintegral von einem Schreiber ausgedruckt. Dieser Wert wurde in die Histogramme übernommen.

Die Längenmessung der Cysten wurde an Brilliant-Sulfaflavin-gefärbten oder ungefärbten Präparaten durchgeführt. Die Cysten wurden mit Hilfe eines Zeichentubus gezeichnet. Die Messung der Längen erfolgte mit einem MOB-Printer.

5. Ergebnisse

Um ein allen SD-Stämmen gemeinsames Merkmal zu finden, das sie ihrerseits vom Wildstamm von *Drosophila melanogaster* unterscheidet, wurde der DNA-Gehalt und der Gehalt basischer Proteine in der Kopf- und der Schwanzregion von elongierten aus 64 Spermatiden bestehenden Cysten sowie von einzelnen Spermatidenkernen von für SD-Faktoren heterozygoten Männchen und von Kontroll-Männchen cytofluorometrisch gemessen. Die so gemessenen Fluoreszenzintensitäten (in AU = arbitrary units, ein relativer Wert, der innerhalb einer Messerie die gleiche Grössenordnung besitzt, zwischen Messerien jedoch verschieden sein kann) lassen sich so als relative Werte für Substanzmengen verwenden (Ruch, 1970). Zusätzlich wurde mit indirekter Immunofluoreszenz versucht, die somatischen Histone H1 und H2A sowie alpha-Tubulin in Spermatiden nachzuweisen. Ausserdem wurde die Länge der Cysten bestimmt. Folgende Resultate wurden erzielt:

5.1. DNA-Gehalt pro Spermatide

Die Messungen des DNA-Gehalts pro Spermatide wurden durchgeführt, da die Meioseuntersuchungen gezeigt haben, dass die Chromosomen in beiden meiotischen Teilungen bei SD normal verteilt werden (Peacock und Erickson, 1965). Es wurde daher angenommen, dass der DNA-Gehalt pro Spermatide bei Segregation Distorter und normalen Männchen von *Drosophila melanogaster* gleich hoch ist und somit als Vergleichswert für die Werte basischer Proteine pro Spermatide dienen kann. Für diese Messungen wurden die Spermatiden mit den Fluoreszenzfarbstoffen BAO oder DAPI gefärbt und anschliessend die Menge gebundenen Farbstoffes cytofluorometrisch gemessen, oder aber ungefärbt mikrospektrometrisch im UV-Bereich gemessen.

5.1.1. BAO-gefärbte Cysten

Die Messwerte der Fluoreszenzintensitäten aller gemessenen Stämme lagen in den Klassen eins, zwei und drei (Abb. 6), mit den Mittelwerten (Tab. 1) von 2460 AU beim Stamm SD(ROMA)^{bw}, 1860 AU beim Stamm SD-5 und 3720 AU beim Wildstamm Eierbrechtstrasse. Bei dem Stamm Eierbrechtstrasse gab es ausserdem Messwerte in der Klasse drei (Abb. 6). Die Mittelwerte lagen bei allen Stämmen in der Klasse eins (Abb. 6, 0-400 AU). Da aber bei dem Kontroll-Stamm als

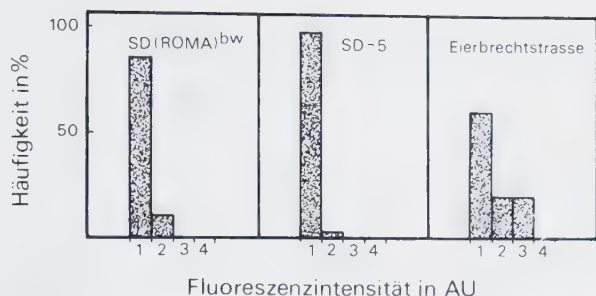


Abb. 6. Relative Fluoreszenzintensität (AU) BAO-gefärbter Cysten. Die Klassenbreite beträgt 4000 AU (AU = arbitrary units der Fluoreszenzintensität). Es wurden insgesamt 72 Cysten von sieben Männchen gemessen. Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität pro Cyste sind in der Tabelle 1 angegeben.

Tab. 1. Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensitäten (AU) von Kernregionen DAPI- bzw. BAO-gefärbter Cysten. Zahlen in Klammern = Anzahl gemessener Cysten. Insgesamt wurden 313 Cysten von 30 Männchen gemessen. SD(R.) = SD(ROMA)^{bw}, SD-72 = SD-72^{bw}, Eierb. = Eierbrechtstrasse. – = keine Präparate vorhanden. AU = arbitrary units der Fluoreszenzintensität.

	SD(R.)	SD-72	S-90	R-1 ^{bw}	SD-5	cnbw	Eierb.
DAPI	1329 ± 359 (50)	1163 ± 303 (39)	1260 ± 250 (22)	1517 ± 399 (35)	1449 ± 339 (10)	1135 ± 367 (24)	846 ± 336 (61)
BAO	2460 ± 930 (16)	– –	– –	– –	1860 ± 740 (36)	– –	3720 ± 3370 (20)

einzigem Stamm, nebst in den Klassen eins und zwei, ausserdem Messwerte in der Klasse drei (Abb. 6, 8001-12000 AU) gefunden wurden, war der Mittelwert bei diesem höher als bei beiden SD-Stämmen. Das bedeutet, dass der DNA-Gehalt der Cysten des Wildstammes höher war als derjenige der beiden SD-Stämme.

5.1.2. DAPI-gefärbte Cysten

Bei allen untersuchten SD-Stämmen lagen die Messwerte der Fluoreszenzintensitäten in den Klassen eins bis sechs (Abb. 7).

Bei den Kontrollen lagen die Messwerte in den Klassen eins bis fünf (Abb. 7). Bei den SD-Stämmen lagen die Mittelwerte (Tab. 1) in den Klassen drei bis fünf

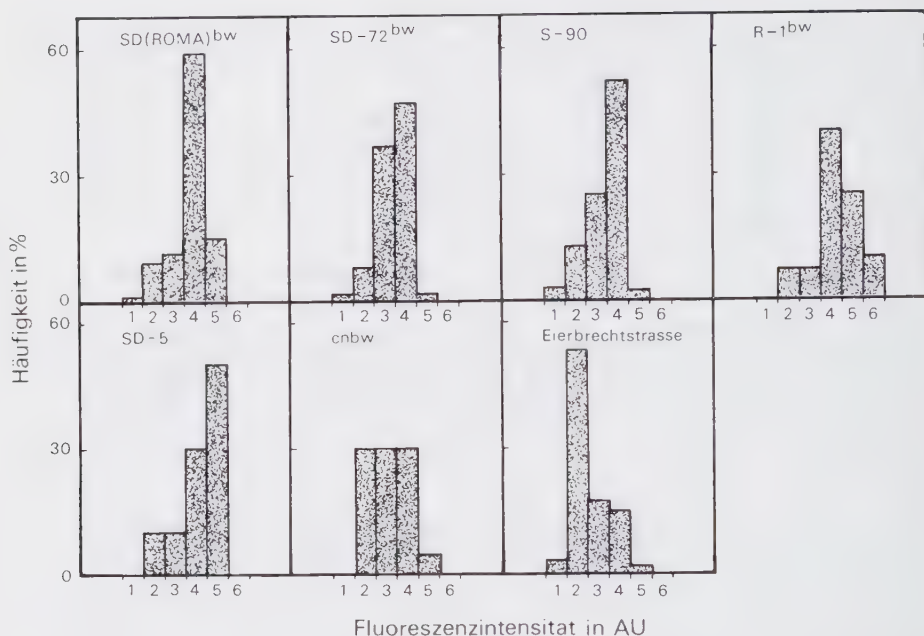


Abb. 7. Relative Fluoreszenzintensität (AU) DAPI-gefärbter Cysten. Die Klassenbreite beträgt 400 AU (AU = arbitrary units der Fluoreszenzintensität). Insgesamt wurden 241 Cysten von 23 Männchen gemessen. Die Mittelwerte pro DAPI-gefärbter Cysten sind in der Tabelle 1 angegeben.

(Abb. 7), bei den Kontrollen dagegen in den Klassen zwei und drei (Abb. 7). Unter der Annahme, dass der Farbstoff DAPI proportional zur DNA-Menge mit der DNA reagiert, wäre demnach der DNA-Gehalt von Stamm zu Stamm verschieden und bei den SD-Stämmen höher als bei beiden Kontroll-Stämmen. Dieses Resultat steht demnach im Gegensatz zu demjenigen, das mit BAO-gefärbten Cysten erzielt worden ist, denn nach der BAO-Färbung wurden die höchsten Fluoreszenzintensitäten bei Kontroll-Männchen, und nicht bei SD-Männchen, gemessen.

5.1.3. Ungefärbte Cysten

Die UV-Messung des relativen Gehalts an DNA in den Messflächen eins, zwei und drei (Abb. 5) wurden bei dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 269 nm durchgeführt (siehe Kapitel 4.4. Messmethoden). Bei beiden diesbezüg-

Tab. 2. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Absorption pro Fläche der Kernregion der Cysten, vor und nach der Behandlung mit pankreatischer Ribonuclease, im UV-Bereich (269 nm). Es wurden n (n = Anzahl) Cysten von insgesamt acht Männchen gemessen. Eib. = Eierbrechtstrasse.

	Vor			Nach			
	Behandlung mit pankreatischer Ribonuclease						
	Messrechtecksfläche			Messrechtecksfläche			
	1	2	3	1	2	3	
SD	$\bar{x} \pm s$	204 ± 127	249 ± 84	185 ± 45	139 ± 61	257 ± 67	178 ± 36
n		(9)	(9)	(9)	(5)	(5)	(5)
Eib.	$\bar{x} \pm s$	199 ± 113	164 ± 81	132 ± 64	185 ± 96	214 ± 75	172 ± 60
n		(10)	(10)	(10)	(5)	(5)	(5)

lich untersuchten Stämmen (Tab. 2) gab es Werte von 132 bis 257 vor und nach der Behandlung mit pankreatischer Ribonuclease, die durchgeführt wurde, um den Absorptionsanteil der Ribonucleinsäuren auszuschliessen. In der Kopfregion der Cysten gab es keine Unterschiede im Nukleinsäuregehalt zwischen dem SD-Stamm und dem Wildstamm. Nach der Behandlung mit RNase gab es in der Kopfregion der Cysten ebenfalls keine Unterschiede im Nukleinsäuregehalt zwischen dem SD-Stamm und dem Wildstamm. In der Schwanzregion der Cysten wurde auch nach der Behandlung mit RNase Absorption gemessen, die in den SD-Stämmen und dem Wildstamm gleich hoch war. Eventuell könnte es sich um mitochondriale DNA handeln.

5.1.4. DAPI-gefärbte einzelne Kerne

Die Messwerte der Fluoreszenzintensitäten der gemessenen SD- und Kontroll-Stämme von *Drosophila melanogaster* können in zwei Gruppen eingeteilt werden (Abb. 8): in der ersten Gruppe lagen die Messwerte hauptsächlich in den Klassen eins und zwei. In der zweiten Gruppe fehlte die Klasse eins und die Messwerte lagen hauptsächlich in den Klassen zwei und drei (Abb. 8, 31-60 AU). Die Mittelwerte (Tab. 6) lagen bei der ersten Gruppe in der Klasse zwei (Abb. 8, 31-60 AU) und bei der zweiten Gruppe in der Klasse drei (Abb. 8, 61-90 AU). Nach dieser Messung ist der DNA-Gehalt der einzelnen Spermatidenkerne nicht bei allen untersuchten Stämmen gleich hoch, und man kann zwischen den SD-Stämmen und den Kontroll-Stämmen nicht unterscheiden.

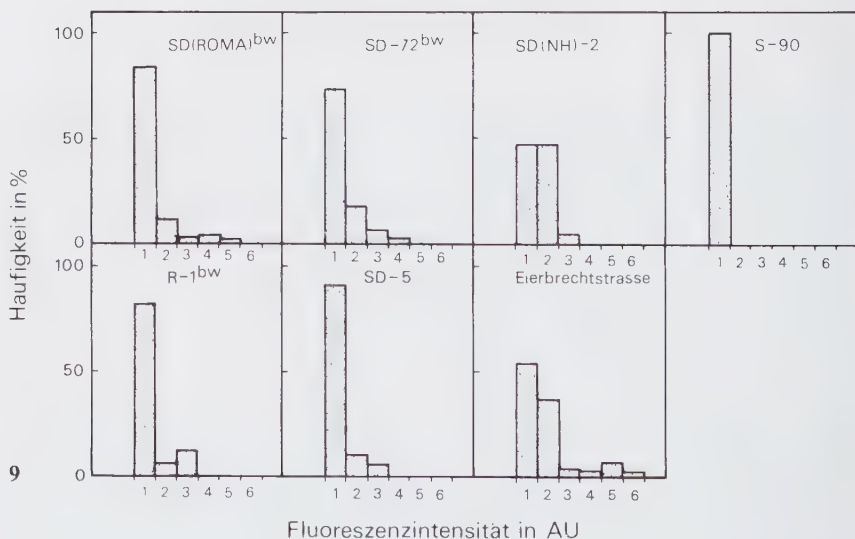
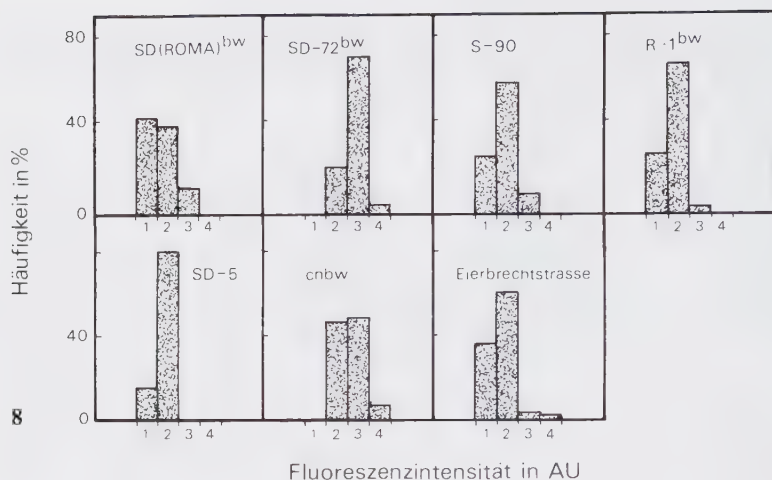


Abb. 8. Relative Fluoreszenzintensität (AU) DAPI-gefärbter Kerne einzelner Spermatozoen. Die Klassenbreite beträgt 30 AU (AU = arbitrary units der Fluoreszenzintensität). Im Ganzen wurden 585 Kerne von 23 Männchen gemessen. Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität pro Kern sind in der Tabelle 6 aufgeführt.

Abb. 9. Relative Fluoreszenzintensität (AU) der Kernregion Brilliant-Sulfaflavin-gefärbter Cysten vor dem Desaminieren. Die Klassenbreite beträgt 1000 AU (AU = arbitrary units der Fluoreszenzintensität). Insgesamt wurden 472 Cysten von 50 Männchen gemessen. Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität pro Cyste sind in der Tabelle 3 angegeben.

Tab. 3. Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensitäten (AU) Brilliant-Sulfaflavin-gefärbter Kopfregionen der Cysten vor und nach dem Desaminieren. Zahlen in Klammern = Anzahl gemessener Cysten. AU = arbitrary units der Fluoreszenzintensität. SD(R.) = SD(ROMA)^{bw}, SD-72 = SD-72^{bw}, SD-NH = SD(NH)-2, Eierb. = Eierbrechtstrasse. – = keine Präparate vorhanden.

	SD(R.)	SD-72	SD-NH	S-90	R-1 ^{bw}	SD-5	Eierb.
Vor Desam.	665 ± 722 (93)	742 ± 838 (97)	1085 ± 546 (48)	156 ± 072 (13)	682 ± 778 (57)	602 ± 675 (76)	1270 ± 1248 (96)
Nach Desam.	124 ± 82 (35)	63 ± 17 (13)	110 ± 92 (36)	– –	84 ± 26 (31)	76 ± 49 (24)	91 ± 85 (93)

5.2. Gehalt basischer Proteine in Spermatiden

Für diese Messungen wurden basische Proteine der Cysten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Brilliant-Sulfaflavin (Leemann und Ruch, 1972) gefärbt und in einem Teil der Präparate vor der Färbung desaminiert, wodurch Lysin der Färbbarkeit entzogen wurde. Es wurden Kopfregionen von Cysten (Abb. 5, 64n), einzelne Spermatidenkerne und die Schwanzregionen der Cysten (Abb. 5) gemessen.

5.2.1. Basische Proteine in der Kopfregion der Cyste

Vor dem Desaminieren lagen bei vier von sechs SD-Stämmen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in den Klassen eins bis drei (Abb. 9). Bei diesen vier Stämmen fehlten die Klassen vier, fünf und sechs (Abb. 9).

Bei allen SD-Stämmen, ausser dem SD(NH)-2, bei dem der Mittelwert (Tab. 3) in der Klasse zwei lag (Abb. 9, 1001 AU- 2000 AU), lagen die Mittelwerte (Tab. 3) in der Klasse eins (Abb. 9, 0-1000 AU) und waren somit niedriger als derjenige des Wildstammes, der in der Klasse zwei lag. Die Mittelwerte der SD-Stämme waren von Stamm zu Stamm verschieden hoch. Diese Messungen besagen, dass der Nukleoproteingehalt der Cysten der SD-Stämme variabel, in allen Fällen niedriger als derjenige des Wildstammes, war.

Nach dem Desaminieren lagen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten aller Stämme in der Klasse eins, weniger Werte in der Klasse zwei (Abb. 10).

Bei den SD-Stämmen sanken nach dem Desaminieren die Mittelwerte je nach Stamm um einen Faktor 5.3 bis 11.7 und beim Wildstamm um einen Faktor 13.9 auf etwa dasselbe Niveau (Tab. 3). Demnach sind die gemessenen Unterschiede im Nukleoproteingehalt zwischen den SD-Stämmen und dem Kontroll-Stamm auf den Gehalt an lysinreichem Protein zurückzuführen.

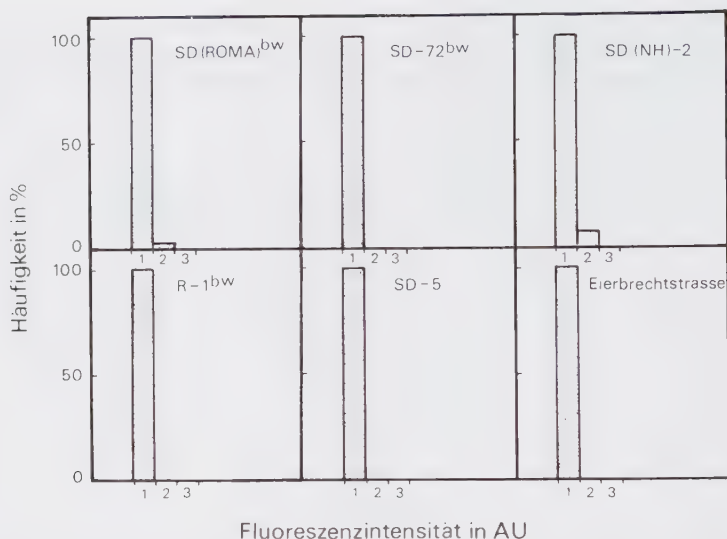


Abb. 10. Relative Fluoreszenzintensität (AU) der Kernregion Brilliant-Sulfaflavin-gefärbter Cysten nach dem Desaminieren. Die Klassenbreite beträgt 300 AU (AU = arbitrary units der Fluoreszenzintensität). Insgesamt wurden 175 Cysten von 24 Männchen gemessen. Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität pro Cyste sind in der Tabelle 3 angegeben.

5.2.2. *Basische Proteine in der Schwanzregion der Cyste*

Vor dem Desaminieren lagen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei allen Stämmen in den Klassen eins bis fünf (Tab. 4, 0-1000 AU). Nur bei den drei SD-Stämmen gab es in einzelnen Abschnitten der Cyste Werte, die bis zu 25mal höher waren als die höchsten Werte der Kontrolle. Diese sind in der Tabelle 4 durch die Klassen sechs und sieben repräsentiert. Der SD-Stamm SD(NH)-2 zeigte gesamthaft mehr basisches Protein im Cytoplasma als die Kontrolle.

Nach dem Desaminieren lagen bei allen Stämmen 98,0% - 100% der gemessenen Fluoreszenzintensitäten in der Klasse eins (Tab. 5, 0-200 AU). Die Klassen zwei und drei (201-600 AU) waren nur bei den Stämmen SD(ROMA)^{bw} (2%), SD(NH)-2 (1,7%) und Eierbrechtstrasse (0,8%) vertreten. Das bedeutet, dass die gemessenen Unterschiede im Gehalt an basischem Protein im Cytoplasma zwischen den SD-Stämmen und dem Kontroll-Stamm auf den Gehalt an lysinreichem Protein zurückzuführen ist.

Tab. 4. Relative Fluoreszenzintensität (AU) von Brilliant-Sulfaflavin-gefärbtem Cytoplasma vor dem Desaminieren. AU = arbitrary units der Fluoreszenzintensität. Als Material dienten Cysten von unterschiedlicher Länge. Eine Messblende mit einem Durchmesser, der der durchschnittlichen Cystenbreite entsprach (22 μ), wurde in Schritten von 22 μ über die Schwanzregion der Cysten geführt (Abb. 5). Es wurde darauf verzichtet, die Gesamtfluoreszenz für individuelle Cysten anzugeben. Stattdessen wurden die Einzelwerte aller Cysten in Klassen geordnet und der Anteil Messwerte pro Klasse in % der Anzahl Messungen (n = 4068) angegeben. Nach dieser Methode wurden 147 Cysten von 25 Männchen gemessen. Die Fluoreszenzintensität der ersten Messblende wurde nicht in diese Tabelle übernommen, da diese bereits in Tabelle 3 enthalten ist.

		Vor dem Desaminieren			
AU	Klasse	SD(ROMA) ^{bw}	SD-72 ^{bw}	SD(NH)-2	Eierb.
0– 200	1	57.7	59.9	6.6	53.8
201– 400	2	37.6	35.4	36.5	43.1
401– 600	3	3.1	3.4	39.1	2.7
601– 800	4	0.3	0.8	10.7	0.2
801– 1000	5	–	–	4.1	0.1
1001–12500	6	0.9	0.4	3.1	–
12501–25000	7	0.3	–	–	–
Summe %		100	100	100	100

Tab. 5. Relative Fluoreszenzintensität (AU) von Brilliant-Sulfaflavin-gefärbtem Cytoplasma nach dem Desaminieren. AU = arbitrary units der Fluoreszenzintensität. Das Messverfahren war das gleiche wie bei Cysten ohne Desaminieren (siehe Tab. 4). Hier wurden 3380 Einzelwerte gemessen. Es wurden 115 Cysten von 24 Männchen gemessen. Die Fluoreszenzintensität der ersten Messblende wurde nicht in diese Tabelle übernommen, weil sie bereits in Tabelle 3 enthalten ist.

		Nach dem Desaminieren			
AU	Klasse	SD(ROMA) ^{bw}	SD-72 ^{bw}	SD(NH)-2	Eierb.
0–200	1	98.0	100	98.3	99.2
201–400	2	1.8	–	1.3	0.7
401–600	3	0.2	–	0.4	0.1
Summe %		100	100	100	100

Tab. 6. Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensitäten (AU) Brilliant-Sulfaflavin-gefärbter und DAPI-gefärbter einzelner Spermatidenkerne. Zahlen in Klammern = Anzahl gemessener Kerne. Es wurden im Ganzen 1481 Kerne von 37 Männchen gemessen. SD(R.) = SD(ROMA)^{bw}, SD-72 = SD-72^{bw}, SD-NH = SD(NH)-2, Eierb. = Eierbrechtstrasse. – = keine Präparate vorhanden. AU = arbitrary units der Fluoreszenzintensität.

	SD(R.)	SD-72	SD-NH	S-90	R-1 ^{bw}	SD-5	cnbw	Eierb.
BSF	64 ± 59 (107)	55 ± 19 (130)	84 ± 58 (189)	61 ± 28 (100)	61 ± 44 (111)	60 ± 31 (103)	– –	83 ± 30 (141)
DAPI	34 ± 18 (4)	68 ± 11 (73)	– –	39 ± 15 (69)	41 ± 11 (69)	36 ± 07 (24)	66 ± 15 (95)	36 ± 13 (230)

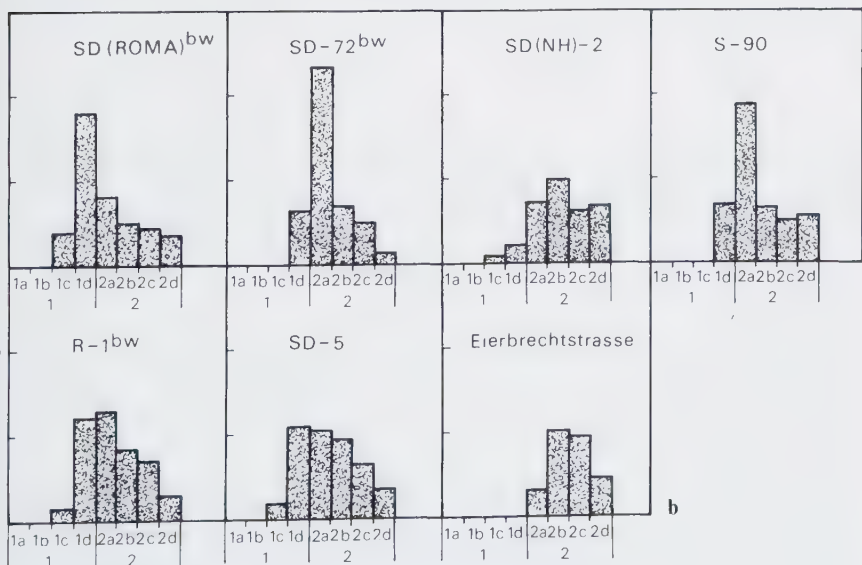
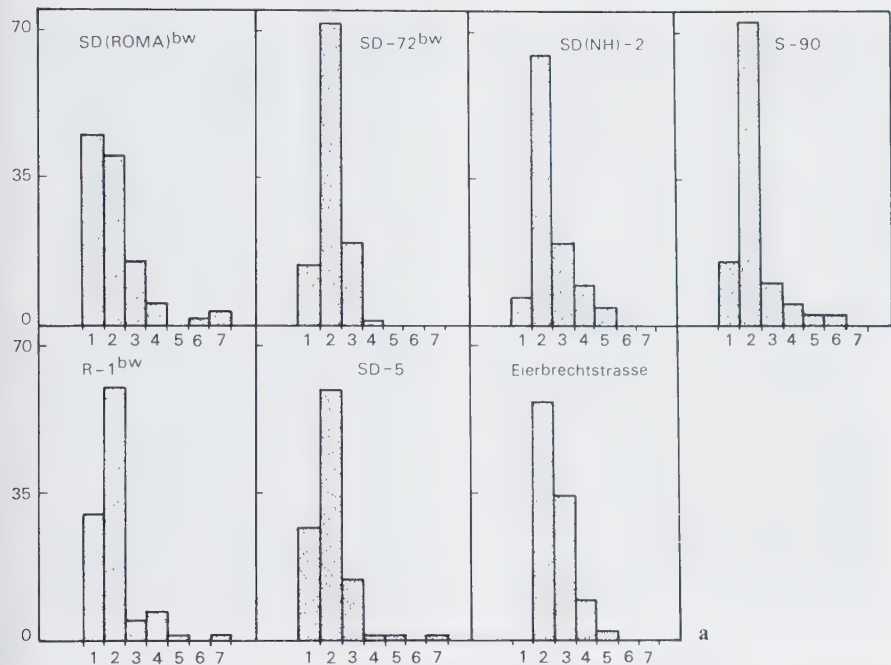
5.2.3. *Basische Proteine im Spermatidenkern*

Vor dem Desaminieren lagen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten beim Wildstamm Eierbrechtstrasse in den Klassen zwei bis fünf (Abb. 11a und 11b, 41-200 AU). Die Klassen eins, sechs und sieben fehlten. Bei den SD-Stämmen waren dagegen auch Fluoreszenzwerte in der Klasse eins zu finden. Bei vier von sechs SD-Stämmen, nämlich bei den Stämmen SD(ROMA)^{bw}, S-90, R-1^{bw} und SD-5, gab es ausserdem Fluoreszenzintensitäten in den Klassen sechs und sieben (Abb. 11a, 201-280 AU).

Bei allen SD-Stämmen, mit Ausnahme des SD(NH)-2, bei dem der Mittelwert (Tab. 6) wie bei der Kontrolle in der Klasse drei lag (Abb. 11a, 11b, 81-120 AU), lagen die Mittelwerte in der Klasse zwei (Abb. 11a, 11b, 41-80 AU), und damit um 25 % niedriger als beim Kontroll-Stamm und dem SD-Stamm SD(NH)-2 (Tab. 6). Da nur bei den SD-Stämmen und nicht beim Kontroll-Stamm Messwerte in der Klasse eins gefunden wurden, und zwar in allen sechs untersuchten SD-Stämmen in bis zu 43 % der untersuchten Spermatiden eines Stammes, gibt es im Hoden von SD-Männchen eine Population von Spermatidenkernen, deren Gehalt an Nukleoprotein niedriger ist als der von Spermatiden des Wildstammes. Dies wird in

Abb. 11a. Relative Fluoreszenzintensität (AU) einzelner Brilliant-Sulfaflavin-gefärbter Spermatidenkerne. Die Klassenbreite beträgt 40 AU (AU = arbitrary units der Fluoreszenzintensität). Im Ganzen wurden 881 Spermatidenkerne von 14 Männchen gemessen. Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität pro Kern sind in der Tabelle 6 angegeben.

Abb. 11b. Relative Fluoreszenzintensität (AU) einzelner Brilliant-Sulfaflavin-gefärbter Spermatidenkerne. Die Klassenbreite beträgt 10 AU (AU = arbitrary units der Fluoreszenzintensität). Die Klassen eins und zwei der Abbildung 11a erscheinen in dieser (Abb. 11b) in je vier Unterklassen.



Fluoreszenzintensität in AU

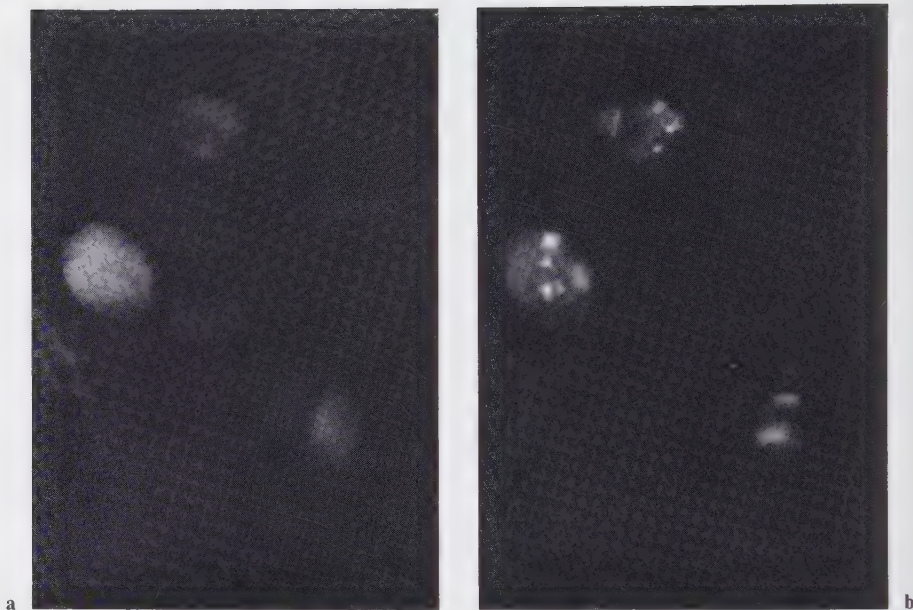


Abb. 12. Indirekte Immunofluoreszenz von Antikörpern gegen H1. Die Spermatocyten stammten von einem Männchen des Wildstammes Eierbrechtstrasse. (a) Lokalisation von H1 im Kern und im Cytoplasma. (b) Lokalisation der DNA mit der DAPI-Färbung in den Chromosomen. Vergrößerung 495fach.

Abbildung 11b, in der die Klassen eins und zwei der Abbildung 11a feiner aufgliedert wurden, besonders deutlich. Bei den SD-Stämmen wurde, mit Ausnahme des SD-72^{bw}, eine grössere Streubreite gefunden als beim Wildstamm, was auf die Werte in den Klassen eins, sechs und sieben zurückzuführen ist. Die Menge basischen Proteins pro Kern bei SD-Stämmen kann also einerseits niedriger und andererseits aber auch höher als bei Spermatiden des Kontroll-Stammes sein.

5.2.4. Nachweis der beiden Histonproteine H1 und H2A mit Hilfe indirekter Immunofluoreszenz

Mit monoklonalen Antikörpern gegen die somatischen Histone H1 und H2A von *Drosophila melanogaster* konnten H1 und H2A in Spermatiden nicht nachgewiesen werden. Die Antikörper banden jedoch an Spermatocyten (Abb. 12). Das Nichtbinden der Antikörper ist nicht mit Sicherheit zu interpretieren, denn es kann das Fehlen von H1 und H2A bedeuten oder H1 und H2A waren in den Spermatiden für den Antikörper nicht zugänglich.

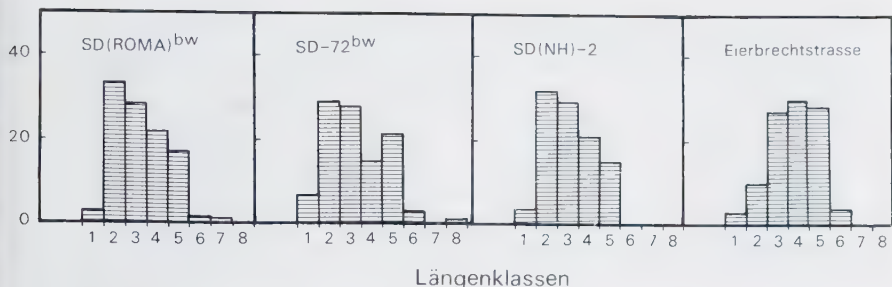


Abb. 13. Cystenlängen der Männchen, die Gelegenheit zur Kopulation hatten. Zum Zeitpunkt der Sektion waren die Männchen bis zu drei Tage alt. Die Klassenbreite beträgt 0.4 mm. In der Längenklasse sieben des Stammes SD(ROMA)^{bw} ist zusätzlich der Wert 4.0 mm enthalten. Die Mittelwerte und die Anzahl der gemessenen Cystenlängen sind in Tabelle 7 enthalten.

5.3. Längenmessung der Cysten

Da es bei den SD-Stämmen in einzelnen Abschnitten der Cyste (Abb. 5) höhere Proteinwerte gab als beim Wildstamm (Tab. 4), wurden Längen von Cysten gemessen, um zu prüfen, ob diese Stammesunterschiede mit einer unterschiedlichen Cystenlänge zwischen den SD-Stämmen und dem Wildstamm erklärbar wären.

Zur Längenmessung elongierender Cysten (Abb. 2, Abb. 3) wurden zwei Männchenserien benutzt. Die Männchen der einen Serie hatten Gelegenheit zur Kopulation, die anderen Männchen nicht.

Serie 1: Die Cystenlängen der Männchen, die bis zu drei Tage alt waren und mit Weibchen zusammen gehalten wurden, also Gelegenheit zur Kopulation hatten, lagen bei den SD-Stämmen hauptsächlich in den Längenklassen zwei bis fünf (Abb. 13). Die Mittelwerte (Tab. 7) lagen bei allen SD-Stämmen in der Klasse drei, d.h. die mittlere Cystenlänge ist bei allen SD-Stämmen gleich. Beim Kontrollstamm wurde die mittlere Cystenlänge in der Klasse vier gefunden. Mit zweifacher Varianzanalyse liessen sich Stammesunterschiede nicht sichern, obwohl die mittlere Cystenlänge des Wildstammes durch einen höheren Mittelwert repräsentiert war als bei den SD-Stämmen, denn bei zwei der drei SD-Stämme wurden die Längenwerte in einer breiteren Streubreite gefunden als beim Kontrollstamm (Tab. 8).

Serie 2: Die Männchen dieser Serie wurden nach dem Schlüpfen isoliert, hatten also keine Gelegenheit zur Kopulation. Sie waren zum Zeitpunkt der Sektion bis zu drei Tage alt. Die Cystenlängen lagen bei allen Stämmen hauptsächlich in den Längenklassen zwei bis fünf (Abb. 14), was einer Streubreite (Tab. 9) von

Tab. 7. Mittelwerte und Standardabweichungen der Cystenlängen (mm) der Männchen, die Gelegenheit zur Kopulation hatten. Zum Zeitpunkt der Sektion waren die Männchen bis zu drei Tage alt. Die Stammesunterschiede liessen sich durch zweifache Varianzanalyse statistisch nicht sichern.

Stamm	$\bar{x} \pm s$	n Cysten	n ♂♂
SD(ROMA) ^{bw}	1.10 ± 0.51	206	8
SD-72 ^{bw}	1.12 ± 0.57	106	5
SD(NH)-2	1.05 ± 0.43	148	8
Eierbrechtstrasse	1.33 ± 0.45	104	8

Tab. 8 Median der Cystenlängen (mm) der Männchen, die Gelegenheit zur Kopulation hatten. Die Männchen waren bis zu drei Tage alt zum Zeitpunkt der Sektion.

Stamm	Median	range
SD(ROMA) ^{bw}	1.0	0.3–4.0
SD-72 ^{bw}	0.9	0.2–3.3
SD(NH)-2	0.9	0.2–1.9
Eierbrechtstrasse	1.3	0.3–2.3

Tab. 9. Median der Cystenlängen (mm) der Männchen, die keine Gelegenheit zur Kopulation hatten. Das Alter der Männchen ist in Tagen (Tag = d) angegeben. In Klammern = range in mm.

Stamm	Median		
	(1d)	(2d)	(3d)
SD(ROMA) ^{bw}	0.9 (0.2–2.0)	0.8 (0.2–1.9)	1.0 (0.3–2.2)
SD-72 ^{bw}	0.9 (0.2–2.0)	1.0 (0.2–2.0)	1.0 (0.2–2.1)
SD(NH)-2	0.9 (0.3–2.0)	1.0 (0.3–2.1)	1.1 (0.2–1.8)
Eierbrechtstrasse	0.9 (0.2–1.7)	1.0 (0.3–2.0)	1.1 (0.3–1.9)

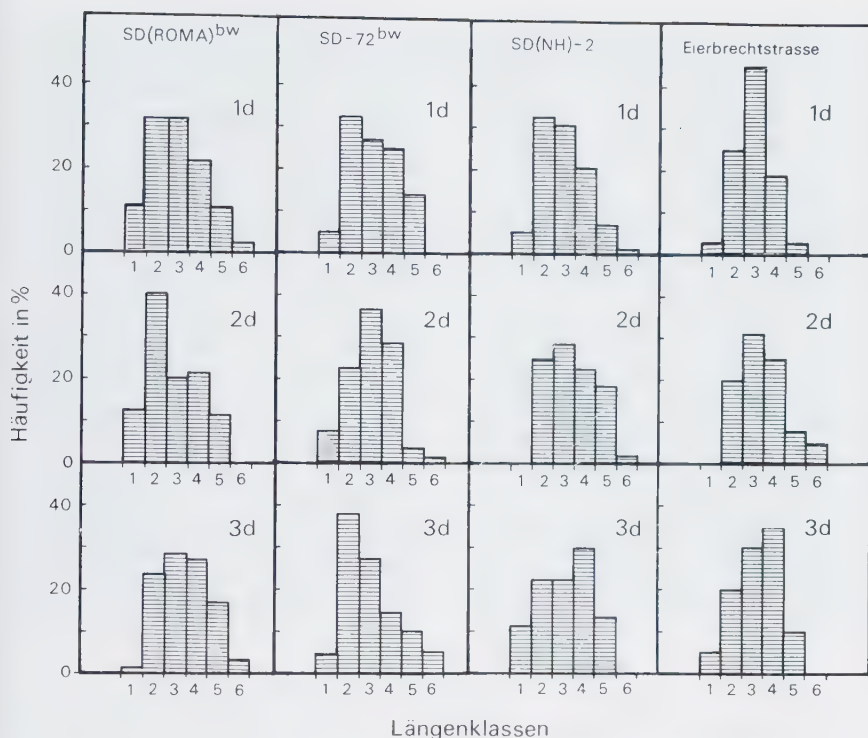


Abb. 14. Cystenlängen der Männchen, die keine Gelegenheit zur Kopulation hatten. Das Alter der Männchen ist in Tagen (Tag = d) angegeben. Die Klassenbreite beträgt 0.4 mm. Die Mittelwerte der Cystenlängen sind in der Tabelle 8 enthalten.

0.2 mm bis 2.2 mm entspricht. Die Klassen eins und sechs waren nicht immer vertreten. Die doppelte Varianzanalyse der mittleren Cystenlängenwerte (Tab. 10) ergab zwar signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen zwei Tage alten Männchen des Stammes SD(ROMA)^{bw} und drei Tage alten Männchen des Stammes SD(NH)-2 gegenüber jeweils gleichaltrigen Männchen des Kontrollstammes, jedoch liessen sich die Unterschiede im Gehalt an basischem Protein in einzelnen Abschnitten der Cyste damit nicht erklären. Hingegen ist aufgrund der Streubreite der Längenwerte, die bei den SD-Männchen mit Gelegenheit zur Kopulation grösser war als bei allen anderen Männchen, anzunehmen, dass die SD+-Spermien im Hoden verblieben sind und auf die Elongation eingewirkt haben könnten.

Tab. 10. Mittelwerte und Standardabweichungen der Cystenlängen (mm) der Männchen, die keine Gelegenheit zur Kopulation hatten. Das Alter der Männchen zum Zeitpunkt der Sektion ist in Tagen (Tag = d) angegeben. Die zweifache Varianzanalyse zeigte, dass die Cystenlängen der Männchen der vier Stämme weder zwischen den Männchen verschiedenen Alters, aber des gleichen Stammes, noch zwischen den gleichaltrigen Männchen verschiedener Stämme signifikante Unterschiede aufweisen. Nur die Cystenlängen der Männchen (2d) des Stammes SD(ROMA)^{bw} und die Cystenlängen der Männchen (3d) des Stammes SD(NH)-2 unterscheiden sich signifikant ($p < 0.05$) von den Cystenlängen gleichaltriger Männchen des Wildstammes Eierbrechtstrasse. n = Anzahl gemessene Cysten von je vier Männchen.

Stamm	$\bar{x} \pm s$					
	(1d)	n	(2d)	n	(3d)	n
SD(ROMA) ^{bw}	0.98 ± 0.45	84	0.94 ± 0.47	84	1.16 ± 0.46	78
SD-72 ^{bw}	1.04 ± 0.43	91	1.02 ± 0.39	80	1.04 ± 0.50	85
SD(NH)-2	0.97 ± 0.41	67	1.14 ± 0.44	82	1.13 ± 0.39	80
Eierbrechtstrasse	0.95 ± 0.33	75	1.14 ± 0.44	76	1.13 ± 0.39	75

5.3.1. Nachweis von alpha Tubulin in elongierenden Cysten

Aufgrund der Vermutung, dass die Regulation der Elongation (siehe dazu Abb. 2 und Abb. 3) bei den SD-Stämmen im Vergleich zum Wildstamm gestört sein könnte, stellte sich die Frage, ob die Störung eventuell mit indirekter Immunofluoreszenz gezeigt werden könnte. Die Bindung des monoklonalen Antikörpers gegen alpha Tubulin (Kilmartin, Wright und Milstein, 1982) äusserte sich jedoch bei beiden untersuchten Stämmen, dem SD(ROMA)^{bw} und dem Wildstamm, in einer Längsstreifung des Spermatids im Kern- und im Schwanzbereich (Abb. 15). Augenfällige Unterschiede zwischen den Stämmen wurden also nicht gefunden. Es ist aber nicht auszuschliessen, dass biochemische Unterschiede gefunden werden könnten.

5.4. Unterschiede in der Anzahl mit Brilliant-Sulfaflavin gefärbter Cysten pro Hoden vor und nach Desaminieren

Diese Zählung wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob Histontransition bei den SD-Stämmen und dem Wildstamm zum gleichen Zeitpunkt erfolgt. Unter der Annahme, dass nach dem Desaminieren nur Cysten mit erfolgter Histontransition fluoreszieren, wurden den Männchen beide Schenkel des paarigen Hodens ent-

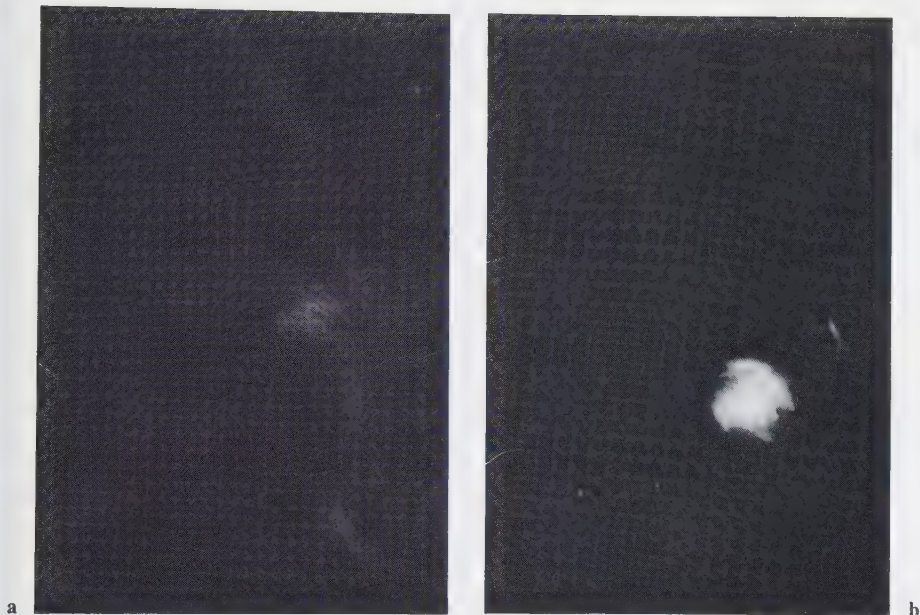


Abb. 15. Indirekte Immunofluoreszenz von Antikörpern gegen alpha Tubulin. Die elongierende Cyste stammte von einem Männchen des Wildstammes Eierbrechtstrasse. (a) Lokalisation von Tubulin im Kern- und im Schwanzbereich. (b) Lokalisation von DNA mit DAPI-Färbung im Kernbereich. Vergrößerung 495fach. Bei dem Stamm SD(ROMA)^{bw} gab es dieses Fluoreszenzmuster auch.

nommen, fixiert und gefärbt, wobei der eine Hoden noch zusätzlich vor der Färbung desaminiert wurde. Die Zählung gefärbter Cysten pro Hoden vor und nach Desaminieren ergab folgendes Bild:

Vor dem Desaminieren zeigten die untersuchten SD-Stämme alle wenigstens einige, bis maximal 35 gefärbte Cysten pro Hoden (Abb. 16). Die SD-Stämme unterschieden sich nicht vom Wildstamm Eierbrechtstrasse. Nach dem Desaminieren (Abb. 16) zeigten alle vier der untersuchten Stämme neben Männchen mit gefärbten Cysten in beiden Hoden auch Männchen ohne gefärbte Cysten im desaminierten Hoden. Keines der drei untersuchten Männchen des Stammes SD-72^{bw} zeigte nach dem Desaminieren noch fluoreszierende Cysten. Beim Stamm SD(ROMA)^{bw} betrug das Verhältnis von fluoreszierenden Cysten vor bzw. nach Desaminieren 5:1 ebenso wie auch beim Wildstamm Eierbrechtstrasse. Diese Zählungen bestätigen den bereits beschriebenen Befund, dass Spermatiden von *Drosophila melanogaster* mindestens zwei spermatidenspezifische Nukleopro-

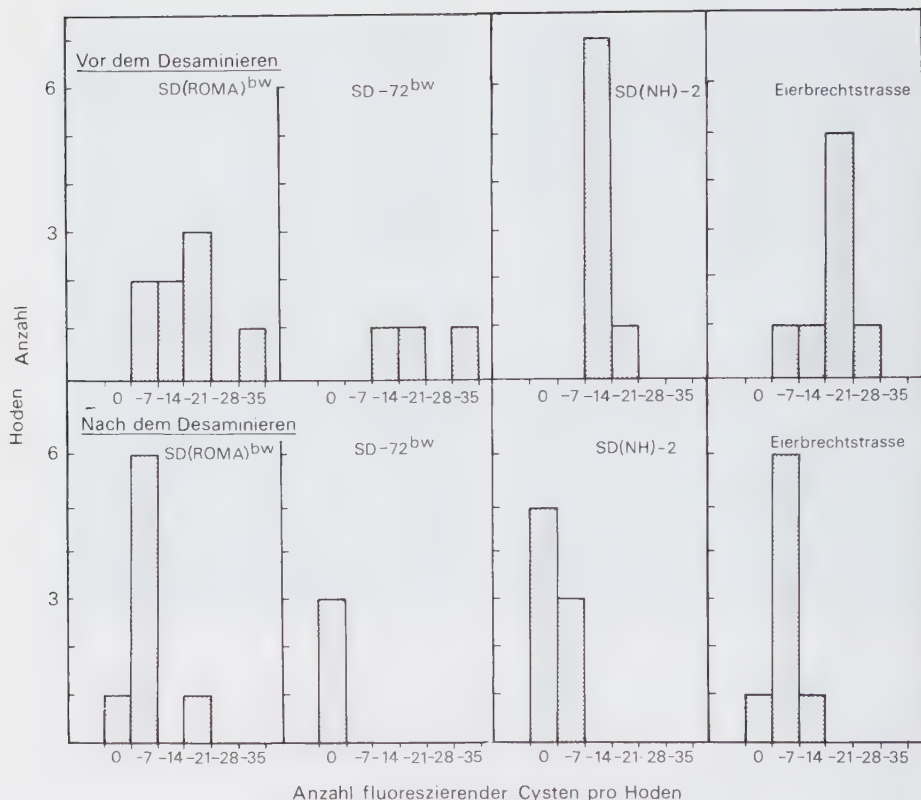


Abb. 16. Anzahl fluoreszierende Cysten pro Hoden. Pro Männchen wurden zwei Schenkel des paarigen Hodens seziiert. Von jedem Männchen wurde ein Schenkel des Hodens vor der Brilliant-Sulfaflavin-Färbung desaminiert, der andere nicht.

teine enthalten, die an der Histontransition beteiligt sind. Da die Männchen aller Stämme zwar lysinreiches basisches Protein besaßen, aber es unter diesen zugleich welche gab ohne argininreiches basisches Protein, ist anzunehmen, dass zunächst ein lysinreiches basisches Protein vorhanden ist, das nach dem Desaminieren nicht mehr sichtbar gemacht werden konnte. Unterschiede in der Anzahl gefärbter Cysten pro Hoden vor und nach dem Desaminieren gab es zwischen den SD-Stämmen und dem Wildstamm nicht. Das bedeutet, dass Histontransition von lysinreichem zu argininreichem basischem Protein bei allen Stämmen gleichzeitig erfolgt.

Tab. 11. Zeitabhängigkeit der Fertilität eines SD-Stammes und zweier Kontroll-Stämme. Die virginellen Weibchen des für die beiden Loci cinnabar und brown homozygoten Stammes waren zwei Tage alt. Die Männchen wurden ohne vorheriges Narkotisieren mit den Weibchen für eine Stunde zusammengebracht und anschliessend ohne zu Narkotisieren wieder entfernt. h = Alter der Männchen in Stunden. Für jedes zu testende Alter wurden andere Männchen und Weibchen verwendet.

h	Paare mit Nachkommen in %					
	SD(NH)-2		cnbw		Eierbrechtstrasse	
	%	n Paare	%	n Paare	%	n Paare
4	0	20	0	26	0	30
12	21.4	14	6.2	16	14.3	14
24	47.3	19	14.8	27	44.4	36

5.5. Zusammenhang zwischen dem Auftreten spermien-spezifischer Proteine und Beginn der Fertilitätsperiode

Wie aus dem Kapitel 5.4. hervorgeht, gab es offenbar unter den untersuchten Männchen, deren Alter zum Zeitpunkt der Sektion die Zeitspanne von Null bis drei Tage (Null = frisch geschlüpft) umfasste, sowohl bei den SD-Stämmen als auch beim Wildstamm Männchen, in deren Spermatiden keine argininreichen basischen Proteine dargestellt werden konnten. Das Auftreten dieser argininreichen basischen Proteine, die vermutlich für die Funktionstüchtigkeit der Spermien notwendig sind, ist nicht unbedingt mit dem Schlüpfen der Männchen korreliert. Ein zeitliches Zusammenfallen vom ersten Auftreten der argininreichen Proteine in den Spermatiden und dem Beginn der Fortpflanzungsperiode wäre ein Hinweis auf die Bedeutung der spermien-spezifischen basischen Proteine für die Fertilität. Männchen im Alter von 4, 12 und 24 Stunden wurden auf Fortpflanzungsfähigkeit geprüft. In keinem der drei geprüften Stämme (Tab. 11) wurde von 4 Stunden alten Männchen Nachkommenschaft erhalten, wohl aber von 12 Stunden alten Männchen. Der prozentuale Anteil der Paare mit Nachkommen (100% = Anzahl der angesetzten Paare je Stamm und je Alter) lag sowohl für 12 wie für 24 Stunden alte Männchen beim SD-Stamm höher als bei den beiden Kontroll-Stämmen. Bei allen Stämmen verdoppelte sich die Anzahl fertiler Männchen im Zeitraum von 12 bis 24 Stunden nach dem Schlüpfen der Männchen. Ein zeitliches Zusammenfallen des Beginns der Fertilitätsperiode und des Erwerbs argininreicher Spermienproteine, und damit der Histontransition, ist damit also nicht bewiesen, jedoch wird diese Hypothese dadurch unterstützt.

6. Diskussion

Von den Nachkommen heterozygoter SD-Männchen tragen 90-100% die SD-Loci. SD+-Nachkommen sind selten oder fehlen. Dieser Ausfall wird auf das Nichtfunktionieren der SD+-Spermien zurückgeführt (Hartl und Hiraizumi, 1976). Bei SD-Männchen wurden verschiedene Aberrationen der Spermiendifferenzierung beschrieben (Hauschteck-Jungen und Hartl, 1978, 1982; Kettaneh und Hartl, 1976, 1980; Tokuyasu, Peacock und Hardy, 1977), unter anderem eine vom Wildstamm abweichende Histontransition (Kettaneh und Hartl, 1976; Hauschteck-Jungen und Hartl, 1982). Der Begriff Histontransition dient im folgenden zur Bezeichnung der histochemisch beobachtbaren Veränderungen basischer Proteine, die erstmals für *Drosophila melanogaster* von Das, Kaufmann und Gay (1964) nachgewiesen wurden. Von Hauschteck-Jungen und Hartl (1982) wurde zwar beschrieben, dass in Cysten von SD-Männchen in einem Teil der Zellkerne die Histontransition gestört ist, aber dieser Befund wurde nur an einem einzigen Stamm erhoben. Es wäre also durchaus denkbar gewesen, dass hier eine stammspezifische Aberration erfasst wurde, die kein für SD-Männchen allgemein gültiges Merkmal darstellt. Daher wurde die Histontransition bei Stämmen aus unterschiedlichen geographischen Regionen geprüft.

Die Histontransition wurde histochemisch mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Brilliant-Sulfaflavin beobachtet. Die qualitative Beurteilung einer Fluoreszenzintensität im Mikroskop ist ungenügend, wenn der Verdacht besteht, dass eventuell geringe quantitative Unterschiede zwischen Zellen über deren Funktionstüchtigkeit entscheiden. Es wurde daher die Menge des von Spermatiden gebundenen Farbstoffes quantitativ cytofluorometrisch bestimmt. Es wurden solche Kerne für die Messung selektioniert, die die Elongation abgeschlossen hatten, und die Auswahl erfolgte im Phasenkontrastverfahren. Auf diese Weise wurden mit Sicherheit Kerne verschiedener Differenzierungsstadien, nämlich solche zu Beginn der Histontransition als auch solche nach Abschluss der Histontransition erfasst. Als Vergleichsbasis für den relativen Gehalt basischer Proteine, deren Veränderung während der Spermatogenese zu quantifizieren Ziel dieser Arbeit war, wurde der relative DNA-Gehalt, der in der haploiden Phase konstant ist, cytofluorometrisch bestimmt.

6.1. Relativer DNA-Gehalt der Spermatiden von SD-Stämmen und Kontroll-Stämmen nach BAO- bzw. DAPI-Färbung

Unter der Annahme, dass bei SD-Stämmen die Meiose normal verläuft, war zu erwarten, dass sich SD-Stämme und Wildstamm im relativen DNA-Gehalt pro Cyste nicht unterscheiden. Wie die cytofluorometrische Messung BAO-gefärbter

Cysten zeigte, lagen die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei dem Wildstamm Eierbrechtstrasse aber höher als bei den SD-Stämmen, nämlich bei 3720 AU gegenüber 2460 AU und 1860 AU bei den Stämmen SD(ROMA)^{bw} und SD-5. Dieser Unterschied lässt sich unter zu Hilfenahme von Befunden am SD-Stamm SD(NH)-2 (Hauschteck-Jungen und Hartl, 1978), folgendermassen erklären: Bei diesem SD-Stamm befinden sich nicht immer alle 64 Kerne einer Cyste am anterioren Ende der Cyste, sondern eine variable Anzahl Kerne sind in der Schwanzregion nachzuweisen. Bei Kontroll-Männchen liegen meistens alle 64 Kerne zusammen in der Kopfregion der Cyste. Dies würde bedingen, dass die höchsten Fluoreszenzwerte in der Kopfregion bei Kontroll-Männchen gemessen wurden. Ein völlig anderes Resultat ergab die cytofluorometrische Messung DAPI-gefärbter Cysten. Die niedrigste Fluoreszenzintensität wurde beim Wildstamm Eierbrechtstrasse gefunden. Der Mittelwert war kleiner als bei allen SD-Stämmen, nämlich 846 AU beim Wildstamm Eierbrechtstrasse und zwischen 1163 AU und 1517 AU bei den SD-Stämmen. Der zweite Kontroll-Stamm, nämlich der für die beiden Loci cinnabar und brown homozygote Stamm, hatte einen Mittelwert von 1135 AU, und lag somit zwischen demjenigen des Wildstammes und denjenigen der SD-Stämme.

Dieser mit der Messung DAPI-gefärbter Cysten erzielte Befund widerspricht der Erwartung, denn auch mit diesem Farbstoff wäre die niedrigere Fluoreszenzintensität bei den SD-Stämmen und nicht beim Wildstamm zu erwarten gewesen. Tatsächlich wurden Unterschiede zwischen SD-Stämmen und den Kontroll-Stämmen in der Intensität der DAPI-Fluoreszenz nicht gefunden, wenn einzelne Spermatidenkerne gemessen wurden. In den einzeln liegenden Kernen von Spermatiden war die Färbbarkeit der DNA, mit Ausnahme des SD-Stammes SD-72^{bw} (68 AU) und des für die beiden Loci cinnabar und brown homozygoten Kontroll-Stammes (66 AU) ähnlich: es wurden Fluoreszenzintensitäten zwischen 34 AU und 41 AU gemessen.

Eine mögliche Deutung dieser Befunde ergibt sich im Zusammenhang mit der in der Postelongation stattfindenden Histontransition. Die sich scheinbar widersprechenden Resultate, die einerseits an ganzen Cysten und andererseits an Einzelkernen gewonnen wurden, müssen zunächst getrennt betrachtet werden. Zunächst sollen die an ganzen Cysten gewonnenen Messwerte betrachtet werden. Möglicherweise war der Fluoreszenzwert beim Wildstamm deswegen unerwartet niedrig, weil als Folge der Histontransition, die bei Kontroll-Männchen in allen Spermatidenkernen stattfindet, die DAPI-Färbbarkeit der DNA reduziert wurde. Die höheren Fluoreszenzwerte bei den SD-Stämmen wären dann zu erwarten, wenn die Histontransition bei SD-Männchen gestört ist oder ev. sogar ganz fehlt. An die DNA von Spermatidenkernen ohne spermienspezifische Proteine könnte der Farbstoff besser binden als an Kerne mit spermienspezifischen Proteinen. Die Cysten bei Kontroll-Männchen bestehen aus einer homogenen Zellpopulation bezüglich Histontransition, während Cysten von SD-Männchen ev. Spermatiden mit normaler wie solche mit fehlerhafter Histontransition enthalten (Hauschteck-Jungen und Hartl, 1982). Demnach wäre es denkbar, dass der Fluoreszenzwert von Cysten bei SD-Männchen höher lag als bei Kontroll-Männchen.

Es stellt sich nun die Frage, ob die Werte der Einzelkerne dem niedrigen Mittelwert der Cysten von Kontroll-Männchen oder den höheren Werten der Cysten von SD-Männchen entsprechen oder keinem von beiden. Spermatiden mit fehlerhafter Histontransition können weitere Aberrationen zeigen, so z.B. Ausbleiben der Elongation oder Verlagerung des Kerns innerhalb der Cyste. Da vorwiegend bereits elongierte Spermatidenkerne gemessen wurden, wurde wahrscheinlich bei SD-Männchen vornehmlich die DNA bei den sich normal differenzierenden SD-Spermatiden gemessen. In diesem Fall wäre bei der überwiegenden Anzahl gemessener Kerne die Histontransition normal erfolgt und die homogenen DNA-Werte der Spermatidenkerne von Kontroll- und SD-Stämmen würden den niedrigen DNA-Werten der Cysten des Kontroll-Stammes entsprechen. Für die höheren Werte der Einzelkerne der Stämme SD-72^{bw} und cnbw/cnbw bot sich keine Deutung an.

Die Fluoreszenzintensität von BAO-gefärbten einzelnen Spermatidenkernen konnte nicht gemessen werden, denn die BAO-Fluoreszenzintensität der Spermatidenkerne war im Vergleich zum Background zu gering.

Der cytofluorometrisch gemessene relative DNA-Gehalt wurde nicht als Vergleichsbasis für die relativen Werte basischer Proteine benutzt, da die Unterschiede im relativen DNA-Gehalt möglicherweise in Abhängigkeit von dem zu bestimmenden Proteingehalt schwankten.

6.2. Relativer Gehalt basischer Proteine der Spermatiden von SD-Stämmen und Kontroll-Stämmen nach Brilliant-Sulfaflavin-Färbung

Die cytofluorometrische Messung des relativen Gehalts basischer Proteine von einzelnen Spermatidenkernen ergab bei allen Stämmen eine grosse Variabilität. Bei allen SD-Stämmen, mit Ausnahme des SD(NH)-2, der einen ähnlich hohen Mittelwert der Fluoreszenzintensität hatte wie der Wildstamm, waren die Mittelwerte niedriger als beim Wildstamm. Die Varianz der Fluoreszenzwerte war bei den SD-Stämmen abgesehen vom SD-72^{bw} grösser als beim Wildstamm. Die niedrigsten und die höchsten Einzelwerte wurden bei den SD-Stämmen gemessen. Alle sechs untersuchten SD-Stämme zeigten je nach Stamm bis 43% elongierte Kerne mit einem so niedrigen Fluoreszenzwert wie er bei der Kontrolle nicht gefunden wurde. Unter der Annahme, dass bei SD+-Spermatiden die Histontransition gestört ist, repräsentieren diese niedrigen Messwerte die SD+-Spermatiden. Da die Hälfte aller Spermatiden SD+ sind, sollte auch in der Hälfte der Spermatidenkerne die Histontransition gestört sein. Da aber bei SD-Männchen die SD+-Kerne nicht alle elongieren und auch nicht unbedingt in der Kernregion zu finden sind (Hauschteck-Jungen und Hartl, 1978), also bei der Messung auch nicht berücksichtigt wurden, liegt erwartungsgemäss die Anzahl Kerne mit niedrigem Fluoreszenzwert unter 50%. Die vorliegenden Resultate zeigen, dass die Störung der Histontransition ein gemeinsames Merkmal aller SD-Stämme ist. Die einzelnen, um ein Drittel höher als bei dem Kontroll-Stamm liegenden Werte der SD-Stämme deuten darauf hin, dass im Kontroll-Stamm ev. keine Sättigung des Kerns mit Protein erreicht wird. Andererseits ist mit der angewandten Methode

auch ungebundenes Protein nachweisbar. Ausserdem sagen diese Resultate nicht aus, ob im Kontroll-Stamm und in den SD-Stämmen die gleiche Menge Protein synthetisiert wird und nur die Bindung des Proteins an SD+-Spermatiden ausfällt.

Die cytofluorometrische Messung des relativen Gehalts basischer Proteine der Cysten der SD-Stämme und des Kontroll-Stammes ergab bei allen SD-Stämmen, mit Ausnahme des SD(NH)-2, der einen fast so hohen Fluoreszenzwert hatte wie der Wildstamm, niedrigere Fluoreszenzwerte als beim Wildstamm. Die niedrigen Fluoreszenzwerte bei den SD-Stämmen sind zum Teil auf die verminderte Anzahl von Spermatidenkernen in der Kopfregion der Cysten zurückzuführen (Hauschteck-Jungen und Hartl, 1978), aber zum anderen Teil vermutlich auf die zu beweisende gestörte Histonttransition bei den SD-Stämmen. Nach Desaminieren zeigten SD-Stämme und Kontroll-Stamm keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der Kopfregion von Cysten mehr. Da die angewandte Methode hauptsächlich Lysin der Färbbarkeit entzieht, und die Restfluoreszenz vorwiegend den Argininanteil repräsentiert, unterscheiden sich die untersuchten Stämme in einem lysinreichen Proteintyp.

Die Absorptionsmessungen ungefärbter Cysten im UV-Bereich zeigten, dass es auch im Cytoplasma der Cysten Substanzen gibt, die im UV-Bereich absorbieren. Im Gehalt wurden keine Unterschiede zwischen den SD-Stämmen und dem Wildstamm gefunden.

Brilliant-Sulfaflavin färbt nicht nur die basischen Proteine des Kerns sondern auch die des Cytoplasmas, also in der vorliegenden Untersuchung die Schwanzregion der Spermatiden. Die Messung der Fluoreszenzintensität der gesamten Schwanzregion ergab Unterschiede zwischen den Stämmen. Um auszuschliessen, dass diese Unterschiede nicht Unterschiede in den Schwanzlängen anstatt solche im Gehalt basischer Proteine darstellen, wurden die Cystenlängen gemessen. Mit den Ergebnissen der Cystenlängenmessungen lassen sich die Unterschiede zwischen den Stämmen im Gehalt basischer Proteine nicht erklären. Dagegen stellen die Messergebnisse ein eigentliches, unabhängig zu bewertendes Resultat dar. Die Längenmessung der Cysten von Männchen, die bis zu drei Tage alt waren, zeigte, dass die Streubreite der Längenwerte bei den SD-Männchen, die Gelegenheit zur Kopulation hatten, grösser war als die der SD-Männchen, die keine Gelegenheit zur Kopulation hatten. Diese Unterschiede in der Streubreite der Längenwerte gab es nicht bei den Männchen des Wildstammes. Eine mögliche Erklärung der grösseren Streubreite der Längenwerte bei den SD-Männchen mit Gelegenheit zur Kopulation wäre, dass es bei diesen zu einem im Vergleich zum Wildstamm verfrühten oder auch verspäteten Beenden der Elongation kommt. Diese Differenzierungsstörung tritt offenbar nicht schon bei der Ausbildung der ersten Spermien eines Männchens auf, sondern ist mit dem Nachschub von Cysten nach der Kopulation verbunden. Zu dieser Zeit befinden sich im Hoden bereits mehrere hundert ev. tausend von degenerierenden Zellen, die SD+-Spermatiden, die auf die Differenzierung weiterer Spermien einwirken können.

Es wäre denkbar gewesen, dass eine zwischen den SD-Stämmen und dem Wildstamm unterschiedliche Verteilung von Tubulin einen Hinweis bezüglich dieser Regulationsstörung hätte geben können. Aber mit einem monoklonalen

Antikörper gegen alpha Tubulin wurde in den Axonemata und vor allem im Bereich der Spermatidenkerne bei allen Stämmen die gleich starke Antikörperbindung gefunden. Die Bindung des Antikörpers wurde nur bis zum Stadium der Individualisation beobachtet. Dieser Befund stimmt mit den Resultaten von Tokuyasu (1977) überein. Seine elektronenmikroskopische Untersuchung ergab eine Anhäufung von Mikrotubuli im Kernbereich bis einschliesslich zum Stadium der Individualisation.

Heterozygote SD-Männchen produzieren nur halbsoviele Nachkommen wie Kontroll-Männchen (Hartl und Hiraizumi, 1976), was vermutlich auf die gestörte Histontransition in SD+-Spermatiden zurückzuführen ist.

Da die Störung der Histontransition, wie die Einzelkernmessung zeigte, ein gemeinsames Merkmal aller untersuchten SD-Stämme ist, stellte sich die Frage, ob die Spermien der SD-Männchen und der Kontroll-Männchen trotz dieser Störung gleichzeitig reif werden. Es wäre denkbar gewesen, dass diese Störung auch den Reifungsgrad der SD-Spermatiden beeinflusst hätte, denn alle Spermatiden einer Cyste befinden sich während der Spermioghistogenese in einem gemeinsamen Cytoplasma, das eine synchrone Reifung aller Spermatiden einer Cyste gewährleisten sollte.

Unter der Voraussetzung, dass der Erwerb von spermienspezifischen Proteinen, die vorwiegend argininreich sind, und die mit der Brilliant-Sulfaflavin-Färbung und zusätzlicher Desaminierung histochemisch dargestellt werden können, zur Reifung der Spermien beiträgt, wurden die beiden Hoden eines Männchens verschieden behandelt. Ein Hoden wurde desaminiert, der andere nicht. Nach der Brilliant-Sulfaflavin-Färbung wurde in einem der beiden Hoden überwiegend Arginin dargestellt, im anderen Arginin und Lysin. Die Anzahlen gefärbter Cysten in den beiden Hoden wurden miteinander verglichen.

Die Zählung ergab bei allen Stämmen eine grosse Variabilität vor und nach dem Desaminieren. Bei den Männchen aller untersuchten Stämme gab es basische Proteine eines lysinreichen Typs. Die Streubreite der Anzahlen gefärbter Cysten pro Hoden war vor dem Desaminieren grösser (7-35 gefärbte Cysten pro Hoden) als nach dem Desaminieren, wo 0 bis 21 Cysten pro Hoden gefärbt waren. Bei allen Stämmen gab es eine variable Anzahl von Männchen ohne argininreiche spermienspezifische Proteine: Bei dem SD-72^{bw} gab es in keinem der Männchen argininreiche spermienspezifische Proteine, bei dem SD(NH)-2 waren 60%, und bei den Stämmen SD(ROMA)^{bw} und Eierbrechtstrasse je 12% der Männchen ohne argininreiche spermienspezifische Proteine. Eine Erklärung dafür wäre, dass die Stämme SD-72^{bw} und SD(NH)-2 später argininreiche spermienspezifische Proteine erwerben als die Stämme SD(ROMA)^{bw} und Eierbrechtstrasse. Damit wären auch die höheren DAPI-Fluoreszenzwerte bei dem Stamm SD-72^{bw} erklärbar, bei dem argininreiche spermienspezifische Proteine später erscheinen, und dessen DNA daher besser färbbar gewesen wäre als bei den übrigen Stämmen, ausser dem cnbw-Stamm. Diese Hypothese würde bedingen, dass der Erwerb argininreicher spermienspezifischer Proteine erst nach dem Schlüpfen der Männchen erfolgen würde. Der Nachweis entsprach der Erwartung, denn bis zu vier Stunden nach dem Schlüpfen der Männchen produzierten diese noch keine Nachkommen, hingegen mit einem Alter von 12 Stunden gab es bei den Männchen aller Stämme

Tab. 12. K-Werte der Väter der untersuchten heterozygoten SD-Männchen. Zahlen in Klammern = Anzahl der untersuchten Nachkommen. **k** = Anzahl der SD-Tiere / Anzahl der gesamten Nachkommenschaft. **A** = k-Werte der Stämme R-1^{bw}, S-90, SD-72^{bw} und SD(NH)-2, 1986 anschliessend an die Experimente getestet. **B** = k-Werte der Väter der Männchen, die dann seziiert wurden. SD(R.) = SD(ROMA)^{bw}, SD-72 = SD-72^{bw} und SD(NH) = SD(NH)-2. – = keine Nachkommen ausgezählt.

	k-Werte der Väter der untersuchten Männchen					
	R-1 ^{bw}	SD(R.)	SD-5	S-90	SD-72	SD(NH)
A	1.0 (1461) 18 ♂♂	– – –	– – –	1.0 (2060) 31 ♂♂	1.0 (2235) 22 ♂♂	1.0 (596) 9 ♂♂
B	1.0 (176) 4 ♂♂	0.8–1.0 (174) 7 ♂♂	1.0 (25) 3 ♂♂	0.9–1.0 (35) 2 ♂♂	1.0 (135) 4 ♂♂	– – –

Nachkommen. Demnach ist der Erwerb argininreicher spermien-spezifischer Proteine, also die Histontransition, vier Stunden nach dem Schlüpfen der Männchen noch nicht abgeschlossen. Hingegen ist sie 12 Stunden nach dem Schlüpfen in dem Teil der Cysten, der die funktionstüchtigen Spermien enthielt, mit denen vermutlich die Nachkommen des Versuchs produziert wurden, erfolgt. Stammesunterschiede gab es nicht. Die Väter aller untersuchten Männchen produzierten 32 dysfunktionale SD+-Spermien pro Cyste wie aufgrund des k-Wertes von 1.0 ($k = \text{Anzahl SD-Tiere} / \text{Anzahl der gesamten Nachkommen}$) anzunehmen ist (Tab. 12).

Die Variabilität innerhalb der SD-Stämme könnte durch Modifikatoren verursacht werden, die möglicherweise von Stamm zu Stamm verschieden sind (Trippa und Loverre, 1975). Es wäre denkbar gewesen, dass die höheren Fluoreszenzwerte im Cytoplasma der SD-Stämme entstanden wären als Folge einer gegenüber dem Wildstamm verzögerten Elongation der Cysten. Diese Annahme konnte widerlegt werden, denn die Längenmessung der Cysten zeigte, dass die Elongation bei SD-Stämmen und dem Kontroll-Stamm zu ähnlichen Cystenlängen führt. Auffällig war jedoch, dass die Längen einiger Cysten der SD-Männchen die maximalen Längen der Cysten von Kontroll-Männchen überschritten.

6.3. Funktion spermien-spezifischer Proteine

Es wurde gezeigt, dass bei dem heterozygoten SD-Stamm SD-72^{bw} die Hälfte der Spermien gestörte Chromatinkondensation aufweisen (Tokuyasu, Peacock und Hardy, 1972, 1977). Ausserdem fanden Hauschteck-Jungen und Hartl (1982), dass nach Anfärben mit Brilliant-Sulfaflavin die Hälfte der Spermien von für SD

heterozygoten Männchen des SD-Stammes SD(NH)-2 weniger fluoreszierten als die andere Hälfte. Diese verminderte Fluoreszenz wurde auf einen verminderten Gehalt an basischen Proteinen zurückgeführt. Dieser Befund wurde jedoch nur an einem SD-Stamm erhoben und hätte eine von SD unabhängige Eigenart des untersuchten SD-Stammes sein können. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch die Störung der Histontransition in bis zu 43% der Spermatiden für alle sechs aus Japan, USA und Italien stammenden SD-Stämme nachgewiesen und kann somit als generelles Merkmal von SD angesehen werden. Auch der SD-Stamm SD-72^{bw}, bei dem unvollständige Chromatinkondensation in Spermatiden beschrieben wurde (Tokuyasu, Peacock und Hardy, 1972, 1977), weist gestörte Histontransition auf. Der mögliche kausale Zusammenhang zwischen Chromatinkondensation und spermienspezifischen Proteinen wird durch die Befunde an homozygoten SD-Männchen gestützt. Bei solchen sterilen Männchen findet keine Histontransition statt (Kettaneh und Hartl, 1976), und die Chromatinkondensation ist in allen Spermatiden einer Cyste gestört (Kettaneh und Hartl, 1980). Ein direkter Beweis für die Wechselwirkung zwischen Histontransition und gestörter Chromatinkondensation fehlt allerdings noch.

Unter der Voraussetzung, dass Spermienproteine Kondensation des Chromatins bewirken, und damit Gene vermutlich nicht mehr aktiv sein können, erfährt die am Anfang der Arbeit erwähnte Hypothese von Hartl (1973), wonach die gestörte Segregation durch das Aktivwerden von Genen entsteht, die normalerweise stillgelegt sind, eine weitere Unterstützung. Diese Unterstützung wird wahrscheinlich, weil es, wie oben geschrieben, bei dem SD-72^{bw}, und wie es auch für die übrigen SD-Stämme angenommen wird, einen Zusammenhang zwischen einem niedrigen relativen Gehalt spermienspezifischer Proteine und nicht erfolgter Kondensation des Chromatins in Spermienkernen gibt.

Die Variabilität, die durch Sd, Rsp und die Modifikatoren entstehen könnte, sollte sich im k-Wert, d.h. dem Quotienten, der aus der Anzahl der SD-Tiere und der Anzahl der gesamten Nachkommen gebildet wird, äussern, falls die Variabilität mit der gestörten Segregation unmittelbar in Zusammenhang steht. Da aber der k-Wert bei allen SD-Stämmen 1.0 betrug, ist anzunehmen, dass nur die gestörte Histontransition in den SD+-Spermien, die in den einzelnen Spermatidenkernen sichtbar wurde und die innerhalb der SD-Stämme verschieden stark ausgeprägt war, zu dem Nichtweitergeben der SD+-Spermien geführt hat. In der vorliegenden Untersuchung zeigte der Grad der Histontransition eine deutliche Variabilität innerhalb der SD-Stämme. So wurden im Mittel beim SD-Stamm SD(NH)-2 geringere Abweichungen vom Wildstamm im relativen Gehalt basischer Proteine der Spermatidenkerne gefunden als bei den Stämmen SD-5 und SD-72^{bw}. Es ist aber nicht auszuschliessen, dass die anderen Abweichungen von der normalen Spermatogenese, so z.B. die gestörte Regulation der Elongation und der von der Cystenlänge unabhängige höhere Gehalt an basischem Protein im Cytoplasma der Cyste SD-unabhängig sind und zum Ausfall von SD-Spermatiden führen können.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Spermatiden von für SD-Faktoren heterozygoten Männchen von sechs SD-Stämmen von *Drosophila melanogaster* aus unterschiedlichen geographischen Regionen cytofluorometrisch untersucht. Die Messung des Nukleoproteingehalts von Brilliant-Sulfaflavin-gefärbten Cysten (64n) und die Messung weiterer Parameter ergab folgendes Bild:

1. Bei allen SD-Stämmen war der Nukleoproteingehalt der Cysten (64n) von Stamm zu Stamm verschieden und niedriger als derjenige des Kontroll-Stammes. Bei drei SD-Stämmen war er nur halb so hoch wie beim Kontroll-Stamm. Der Nukleoproteingehalt der Cysten der anderen drei SD-Stämme war höher oder niedriger als der halbe Nukleoproteingehalt der Cysten des Kontroll-Stammes.

2. Der Charakter dieses Nukleoproteins ist vorwiegend lysinreichen Typs, denn nach dem Desaminieren, wodurch vorwiegend Lysin der Färbbarkeit entzogen wurde, war der Nukleoproteingehalt der Cysten um einen Faktor 5.3 bis 11.7 bei den SD-Stämmen, und um den Faktor 13.9 beim Kontroll-Stamm, messbar niedriger, bei allen Stämmen auf etwa demselben Niveau.

3. Bei allen SD-Stämmen gab es bis zu 43 % einzelne Spermatiden mit einem niedrigeren Gehalt an Nukleoprotein als beim Wildstamm. Der Mittelwert war daher bis zu 25 % niedriger als beim Wildstamm, obwohl die Streubreite bei diesen grösser als beim Wildstamm war.

4. Auch das Cytoplasma der elongierten Spermatiden enthielt basisches Protein. Alle drei diesbezüglich untersuchten SD-Stämme hatten in einzelnen Abschnitten der Cyste bis zu 25mal höhere Werte als der Kontroll-Stamm. Ein SD-Stamm hatte insgesamt einen höheren Gehalt an basischem Protein als der Kontroll-Stamm. Der Charakter auch dieses Proteins ist vorwiegend lysinreichen Typs, denn nach dem Desaminieren war der gemessene Gehalt an Protein bei allen Stämmen gleichmässig niedrig.

5. Bei den SD-Stämmen wurden doppelt so lange Cysten wie beim Wildstamm mit einer Länge von 4 mm gemessen. Die Streubreite der Cystenlängenwerte war bei den SD-Stämmen grösser als beim Wildstamm.

6. Spermatiden von *Drosophila melanogaster* enthalten mindestens zwei spermatidenspezifische Nukleoproteine: zunächst war ein lysinreiches Protein vorhanden, das in späteren Stadien nicht mehr sichtbar war, und dann ein argininreiches Protein.

7. Bei den SD-Stämmen waren nach der Elongation nicht alle Kerne in der Kernregion der Cyste aufzufinden wie der cytofluorometrisch ermittelte DNA-Gehalt von BAO-gefärbten Cysten (64n) anzeigte.

8. Im Gegensatz dazu war der DNA-Gehalt DAPI-gefärbter Cysten des Wildstammes nur halb so hoch wie bei den SD-Stämmen. Die Ursache konnte nicht geklärt werden. Der DNA-Gehalt einzelner DAPI-gefärbter Spermatidenkerne entsprach ebenfalls nicht der Erwartung: sowohl die beiden Kontroll-Stämme als auch die SD-Stämme waren unter sich verschieden. Der Bindungsmechanismus von DAPI ist nicht bekannt.

Als allen SD-Stämmen gemeinsames Merkmal kann somit nur der niedrigere Gehalt an Nukleoprotein in bis zu 43% der Spermatidenkerne von für SD-Faktoren heterozygoten Männchen bezeichnet werden.

8. Literaturverzeichnis

- BLOCH, D.P., 1966 Cytochemistry of the histones. *Protoplasmatologia* 5: 1-56.
- BRITTNACHER, J.G. und B. GANETZKY, 1983 On the components of segregation distortion in *Drosophila melanogaster*. II. Deletion mapping and dosage analysis of the SD locus. *Genetics* 103: 659-673.
- CROW, J.F., 1979 Genes that violate Mendel's rules. *Sci. Amer.* 240: 104-113.
- DAS, C.C., B.P. KAUFMANN und H. GAY, 1964 Histone-protein transition in *Drosophila melanogaster*. I. Changes during spermatogenesis. *Exp. Cell Res.* 35: 507-514.
- GANETZKY, B., 1977 On the components of segregation distortion in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 86: 321-355.
- HARTL, D.L., 1973 Complementation analysis of male fertility among the segregation distorter chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 73: 613-629. HARTL, D.L., 1974 Genetic dissection of segregation distortion. I. Suicide combinations of SD genes. *Genetics* 76: 477-486. HARTL, D.L., 1975 Segregation distortion in natural and artificial populations of *Drosophila melanogaster*. pp. 83-91. In: *Gamete Competition in Plants and Animals*. Edited by D.L. MULCAHY. North Holland, Amsterdam. HARTL, D.L., 1980 Genetic dissection of segregation distortion. III. Unequal recovery of reciprocal recombinants. *Genetics* 96: 685-696.
- HARTL, D.L. und Y. HIRAIZUMI, 1976 Segregation distortion. pp. 615-666. In: *Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 1b. Edited by M. ASHBURNER und E. NOVITSKI. Academic Press, New York.
- HARTL, D.L., Y. HIRAIZUMI und J.F. CROW, 1967 Evidence for sperm dysfunction as the mechanism of segregation distortion in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58: 2240-2245.
- HAUSCHTECK-JUNGEN, E. und D.L. HARTL, 1978 DNA distribution in spermatid nuclei of normal and segregation distorter males of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 89: 15-35.
- HAUSCHTECK-JUNGEN, E. und D.L. HARTL, 1982 Defective histone transition during spermiogenesis in heterozygous Segregation Distorter males of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 101: 57-69.
- HAUSCHTECK-JUNGEN, E. und B. MAURER, 1976 Sperm Dysfunction in sex ratio males of *Drosophila subobscura*. *Genetica* 46: 459-477.
- HIRAIZUMI, Y. und D.W. MARTIN, 1979 On the models of segregation distortion in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 93: 423-435.
- HIRAIZUMI, Y. und A.M. THOMAS, 1984 Suppressor systems of Segregation Distorter (SD) chromosomes in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 106: 279-292.
- HIRAIZUMI, Y., D.W. MARTIN und I.A. ECKSTRAND, 1980 A modified model of segregation distortion in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 95: 693-706.
- KETTANEH, N.P. und D.L. HARTL, 1976 Histone transition during spermiogenesis is absent in segregation distorter males of *Drosophila melanogaster*. *Science* 193: 1020-1021. KETTANEH, N.P. und D.L. HARTL, 1980 Ultrastructural analysis of spermiogenesis in segregation distorter males of *Drosophila melanogaster*: The homozygotes. *Genetics* 96: 665-683.
- KILMARTIN, J.V., B. WRIGHT und C. MILSTEIN, 1982 Rat Monoclonal Antitubulin Antibodies Derived by Using a New Nonsecreting Rat Cell Line. *J. Cell. Biol.* 93: 576-582.
- LEEMANN, U. und F. RUCH, 1972 Cytofluorometric determinations of basic and total proteins with sulfaflavine. *J. Histochem. and Cytochem.* 20: 659-671.

- LINDSLEY, D.L. und K.T. TOKUYASU, 1980 Spermatogenesis. pp. 225–294. In: Genetics and Biology of *Drosophila*. Vol. 2d. Edited by M. ASHBURNER and T.R.F. WRIGHT. Academic Press, New York.
- LYTTLE, T.W., 1979 Experimental population genetics of meiotic drive systems. II. Accumulation of genetic modifiers of Segregation Distorter (SD) in laboratory populations. Genetics 91: 339–357. LITTLE, T.W., 1984 Chromosomal control of fertility in *Drosophila melanogaster*. I. Rescue of T(Y:A) / bb 1–158 male sterility by chromosome rearrangement. Genetics 106: 423–434. LITTLE, T.W., manuscript in preparation.
- MATTHEWS, K. und M.A. MORTIN, 1983 SD-72 has a temperature-sensitive period during spermiogenesis. Can.J.Genet.Cytol. 25: 662–667.
- NICOLETTI, B., 1968 Il controllo genetico della meiosi. Atti Ass.Genet.Ital. 13: 1–71.
- NICOLETTI, B. und G. TRIPPA, 1967 Osservazioni citogenetiche su di un nuovo caso di segregazione distortion (SD) rivenuto in una popolazione naturale di *Drosophila melanogaster*. Atti Ass. Genet. Ital. 12: 361–365.
- NICOLETTI, B., G. TRIPPA und A. DEMARCO, 1967 Reduced fertility in SD males and its bearing on segregation distortion in *Drosophila melanogaster*. Atti Acad.Naz.Lincei 43: 383–392.
- PEACOCK, W.J. und J. ERICKSON, 1965 Segregation Distortion and regularly nonfunctional products of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. Genetics 51: 313–328.
- RUCH, F., 1970 Principles and some applications of cytofluorometry. Introduction to Quantitative Cytochemistry. Edited by G. Wied, GF Bahr. Vol. 2. Academic Press, New York, 1970, pp. 431–449.
- RUSSELL, W.C., NEWMAN, C. und WILLIAMSON, D.H., 1975 A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. Nature 253: 461–462.
- SANDLER, L. und K. COLIC, 1985 Segregation Distortion in *Drosophila*. TIG: 181–185.
- SANDLER, I. und Y. HIRAZUMI, 1960 Meiotic drive in natural populations of *Drosophila melanogaster*. V. On the nature of the SD region. Genetics 45: 1671–1689.
- SANDLER, L., Y. HIRAZUMI und I. SANDLER, 1959 Meiotic drive in natural populations of *Drosophila melanogaster*. I. The cytogenetic basis of segregation distortion. Genetics 44: 233–250.
- STANLEY, H.P., J.T. BOWMAN, L.J. ROMRELL, S.C. REED und R.F. WILKINSON, 1972 Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. J.Ultrastruct.Res. 41: 433–466.
- TATES, A.D., 1971 Cytodifferentiation during Spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*; an Electron Microscope Study. Proefschrift, Rijksuniversiteit te Leiden.
- TOKUYASU, K.T., 1974a Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. III. Relation between axoneme and mitochondrial derivatives. Exp.Cell Res. 84: 239–250. TOKUYASU, K.T., 1974b Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. IV. Nuclear transformation. J.Ultrastruct.Res. 48: 284–303. TOKUYASU, K.T., 1975a Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. V. Head-tail alignment. J.Ultrastruct.Res. 50: 117–129. TOKUYASU, K.T., 1975b Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VI. Significance of 'onion' nebenkern formation. J.Ultrastruct.Res. 53: 93–112.
- TOKUYASU, K.T., W.J. PEACOCK und R.W. HARDY, 1972a Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process. Z.Zellforsch. 124: 479–506. TOKUYASU, K.T., W.J. PEACOCK und R.W. HARDY, 1972b Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. II. Coiling process. Z.Zellforsch. 127: 492–525. TOKUYASU, K.T., W.J. PEACOCK und R.W. HARDY, 1977 Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VII. Effects of segregation distorter (SD) chromosome. J.Ultrastruct.Res. 58: 96–107.
- TRIPPA, G. und A. LOVERRE, 1975 A factor on a wild third chromosome that modifies the segregation distortion phenomenon in *Drosophila melanogaster*. Genet.Res.Camb. 26: 113–125.

